PU228

Ministère de l'Enseignement Supérieur

et de la Recherche

Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

C. N. R. A.
17. JUIL. 1989
UNITÉ CENTRALE DE DOCUMENTATION
— VERSAILLES —

VOL. 17

1988

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

LB-17

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

COMPTE RENDU ANNUEL DES TRAVAUX DU

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

(Vol. 17, 1988)

S O M M A I R E

COMPTE RENDU SCIENTIFIQUE

I - BIOCHIMIE GENERALE

A - Mécanismes hormonaux de régulation de la glycémie et de la lipémie chez l'Abeille 7

- Interaction du Propranolol et de la somatostatine avec la réponse octopaminergique de la lipémie de l'Abeille in vivo 9

- Comparaison des relations doses/cinétiques sur l'action du glucagon endogène et du glucagon de vertébrés chez l'Abeille 17

- Les "hormones de survie" : Les acides azélaïque et pimélique enlèvent le stress provoqué par les conditions d'isolation dans les stéroïdes et les phospholipides d'Abeilles ouvrières adultes 19

B - Physico-chimie de l'autoxydation des hormones aminergiques 36

- Production de molécules d'oxygène avec un électron libre pendant la péroxidation de la Dopa et la dopamine 37

- Luminescence lors de la réaction de la Dopa avec le peroxyde d'hydrogène 43

C - Enzymologie 63

a) Le système acétylcholinestérasique de l'Abeille 63

- Détermination rigoureuse du coefficient de Hill des enzymes non michaëliennes inhibées par leur substrat .. 64

- Acétylcholinestérase provenant de têtes d'Abeilles Apis mellifera : évidence des formes amphiphiliques et hydrophilique caractérisées par la phase de séparation du Triton X-114 .....
- Propriétés de l'acétylcholinestérase provenant de têtes d'Abeilles Apis mellifera .....
b) Le mécanisme associatif des α-glucosidases de l'Abeille .....
- Spécificité glycosidasique et coopérativité apparente lors de l'aggrégation des protomères asymmétriques de l'enzyme dirigée par le substrat .....
II - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES .....
- Développement de la spectrophotométrie en phase solide sur chromatogrammes en couche mince .....
- Analyse directe par spectrodensitométrie U.V. des phénols libres végétaux séparés sur couches minces de gel de silice .....
- Régression de l'oxydation artéfactuelle des pigments chlorophylliens chromatographiés sur couches minces de gel de silice, par imprégnation des plaques au glucose ou au thiosulfate .....
III - BIOCHIMIE TOXICOLOGIQUE .....
A - Toxicologie théorique .....
- Potentialités algébriques de l'équation de Hill comme alternative à la description des relations doses (ou temps)/effets en toxicologie : une étude théorique .....
B - Thanatologie des larves d'Abeilles .....
- Manisfestation homéostasiques et thanatologiques de la lipémie des larves d'Abeilles du 5e stade conservées hors de leurs alvéoles .....
C - Toxicologie de l'action de la toxine du B.T.i. chez le Moustique .....
- Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de Aedes aegypti (Insecte, Diptère) par la δ-endotoxine de Bacillus thuringiensis israelensis.
- Les amino acides libres de l'hémolymphe impliqués dans l'osmorégulation .....

D - Lutte contre la varroose de l'Abeille 172
- Traitements systémiques.
Les facteurs influençant les traitements par nourrissement 173
- Les recherches contre la varroatose de l'Abeille au laboratoire de biochimie de l'INRA d'Avignon : 1 an après 176
a) Traitements au sulfate de cuivre 179
- Bilan expérimental des potentialités toxiques du sulfate de cuivre dans la lutte contre la varroatose de l'Abeille 180
- Toxicologie du sulfate cuivrique chez l'Abeille :
1 - Nouveaux paramètres algébriques de létalité comme alternative à la DL_{50} 193
E - BIOCHIMIE DES RELATIONS HOTES/PARASITES..... 214
E - 1 - Analyse des réactions aux traitements 216
E - 2 - Etude des phénols végétaux en milieu acide 218
1) Les spectres 219
2) Mobilités relatives après un laps de temps de 0 à 6 heures dans HCl |2N| 220
3) Influence des concentrations en HCl du milieu dans lequel l'étalon est en solution sur les chromatogrammes et sur les spectres 222
BILAN DES COLLABORATIONS EXTERIEURES 227
IV - ENSEIGNEMENT SUPERIEUR 229
V - ETHIQUE DE LA RECHERCHE 231
C.R. ADMINISTRATIF 233
ANNEXES 235
ECHANGES DE TIRES A PART SCIENTIFIQUES ET CLASSEMENT BIBLIOGRAPHIQUE 241
LISTE DES PUBLICATIONS PARUES EN 1988 243

I N T R O D U C T I O N

Au cours de 1988, le laboratoire de Biochimie a poursuivi les deux principales missions qui lui sont assignées, à savoir :

a) l'exploration de nouvelles voies de recherches théoriques et expérimentales.
b) l'exploitation dans le domaine de la toxicologie des connaissances ainsi acquises.

Comme lors des années précédentes, il s'est doté, au passage, d'un certain nombre de techniques nouvelles appropriées.

Les résultats de l'année les plus marquants portent, en enzymologie, sur l'élucidation moléculaire et cinétique du système acétylcholinestérasique de l'abeille, et, en toxicologie, sur l'élaboration de nouveaux concepts ouvrant la voie à la substitution à la DL_{50} de nouveaux paramètres plus objectifs, ainsi que sur le contrôle de la varroatose de l'abeille par les dérivés du cuivre, dont les essais de terrain à grande échelle ont apporté confirmation.

D'autre part, les travaux relatifs à l'action de la toxine entomocide du Bacillus thuringiensis, et à l'interaction entre le Pin sylvestre et ses parasites et pathogènes, se sont poursuivis avec fruit.

Enfin, l'activité d'enseignement supérieur a été poursuivie au même rythme que lors des années précédentes et l'éthique de la recherche a fait l'objet d'une participation à une réflexion de groupe.

COMPTE RENDU SCIENTIFIQUE

I - BIOCHIMIE GENERALE

A - Mécanismes hormonaux de régulation de la glycémie et de la lipémie chez l'Abeille.

Les recherches développées depuis les années 1978 sur les aminergiques et les peptidergiques sont arrivées, en 1988 dans une phase que l'on peut considérer comme (provisoirement) terminale, avec la seconde partie des études sur le mode d'action de l'octopamine. Une partie des travaux se poursuit en collaboration avec l'Allemagne et une autre avec l'Université de Bordeaux (voir plus loin).

D'autres part, l'action des hormones de survie ou "survivones" se manifeste également de manière spectaculaire au niveau des lipides : ceci constitue une conclusion importante (voir ci-après les réactions suscitées lors de la publication) de la thèse que M. Jorand n'a pu finir de rédiger faute de soutien matériel.

Publications :

BOUNIAS, M., 1988. C.R. Soc. Biol., 182, 37-43

JORAND, J.P., BOUNIAS, M. & CHAUVIN, R., 1988-89. Horm. Metab. Res. (manuscrit accepté).

C. R. Soc. Biol., 1988, *182*, 37-43.

Biochimie comparée.

Interaction du propranolol et de la somatostatine avec la réponse octopaminergique de la lipémie de l'Abeille *in vivo*.

par MICHEL BOUNIAS

Laboratoire de Biochimie INRA-Avignon, BP 91, F-84140 Montfavet.

(*reçue le 2 mars 1988*).

Summary. — The injection of DL-octopamine to emerging adult honey bees (1 nanomol per individual) promptly rises the haemolymph levels of steroids, diacyl and triacylglycerols (over 100 % increase occurring after 10 min). Free fatty acids are then increased (by 131 %) 45 mn after injections. These responses are completely abolished by 2.5 nanomol propranolol and 0.07 nanomol cyclic somatostatin. Octopamine thus seems to be more strongly involved in the lipemia than in the glycemia regulation, by contrast with noradrenaline which is, apparently, more active on carbohydrates.

Résumé. — L'injection de DL-octopamine à des abeilles adultes naissantes, à raison de 1 nanomole par individu, entraîne une augmentation (supérieure à 100 %) des concentrations de l'hémolymphe en stéroïdes, diglycérides et triglycérides, 10 mn après injection, suivie d'une augmentation des teneurs en acides gras libres (131 %) au bout de 45 mn. Ces réponses sont complètement neutralisées par 2,5 nmoles de propranolol et 0,07 nmole de somatostatine cyclique.

L'octopamine paraît donc davantage impliquée dans la régulation de la lipémie que dans celle de la glycémie, à l'inverse de la noradrénaline, apparemment plus active sur les glucides.

L'octopamine figure parmi les effecteurs aminergiques dont la présence a été décelée chez l'Abeille (1), aux côtés d'autres hormones, telles que la noradrénaline (2) : le développement de nouvelles méthodes analytiques de haute sensibilité (3) est venu récemment fournir un précieux relai aux techniques d'injection *in vivo*, qui avaient déjà permis, très tôt, la mise en évidence de récepteurs sensibles à l'action de l'adrénaline (4) et de la noradrénaline (5), ainsi que de l'octopamine sur la glycémie de l'Abeille (6).

Chez certains Insectes, en particulier les Orthoptères, la décharge d'octopamine paraît se produire sous l'action d'un stimulus provoqué par l'excitation, les manipulations des animaux (7) ou le déclenchement d'une activité locomotrice (8). Chez l'Abeille, les effets hyperglycémiants de l'octopamine seule sont plus faibles que ceux des autres adrénergiques, mais restent comparables à ceux de l'AMPc, et sont neutralisés par la somatostatine et même le propranolol, un β-bloquant (9), également antagoniste de la noradrénaline chez cet Insecte (10).

Or les β-adrénergiques activent les lipases, par l'intermédiaire de l'AMPc, ce qui se traduit, chez les Vertébrés, par une diminution des concentrations en triglycérides, au profit des acides gras libres (11). Chez les Insectes, l'injection d'octopamine augmente la lipémie totale du Criquet (12), la réponse étant supprimée par l'injection d'un α-antagoniste : la phentolamine. Par contre, chez les Diptères, la synthèse des lipides suivie à partir de la leucine (u)-^{14}C utilisée comme précurseur, est inhibée par des concentrations de 10^{-4} à 10^{-5} M de noradrénaline et d'octopamine; cette dernière stimulerait, par contre, la libération d'acides gras libres, mais avec un maximum d'effet à des concentrations non physiologiques (13).

Comme le propranolol paraît capable chez le Rat d'inhiber les réponses adrénergiques en réduisant le nombre de sites α-apparents (14), il nous a paru intéressant d'analyser l'action de l'octopamine sur les diverses classes de lipides de l'hémolymphe de l'Abeille, dont le système adrénergique paraît ressembler à celui des Vertébrés (9), et d'éprouver l'action éventuelle du propranolol ainsi que de la somatostatine dépourvue d'effets sur l'AMPc (9).

Animaux et méthodes. — Les abeilles de race noire française (*Apis mellifera mellifera* L.) sont prélevées au stade d'adultes naissantes dans les alvéoles encore operculés. Au cours de l'ensemble des expérimentations, il a été utilisé 280 abeilles, d'un poids moyen individuel de 125,2 ± 2,8 mg. Les insectes ont été répartis en lots de 10 individus dans des tubes de Borrel et placés à l'obscurité à 23° C. Chaque lot correspond à une dose injectée et à une durée après les injections.

Les prélèvements d'hémolymphe ont été opérés après 10 mn, et à intervalles de 45 mn jusqu'à 3 heures après les injections. Les lipides ont été extraits à l'aide d'un mélange de chloroforme contenant 15 % de méthanol, à l'aide de micro-homogénéiseurs de type Potter, de contenance 200 µl, fabriqués au laboratoire. Les lipides ont été analysés par chromatographie quantitative en couche mince, selon des techniques précédemment décrites (15). Les valeurs ont été établies à partir des lipides de la série C18:1 ainsi que du mélange (phosphatidyl-inositol + sphingomyéline) comme étalons de référence.

Les doses injectées par abeille sont de 1 nmole de DL-octopamine, 2,5 nmoles de DL-propranolol et 120 µg (0,07 nmole) de somatostatine cyclique. Les témoins reçoivent 0,5 µl du seul soluté isotonique dans lequel sont dissoutes les hormones.

Les probabilités de signification (P) associées aux coefficients de corrélation et aux comparaisons de moyennes et de variances ont été calculées d'après les équations de distributions de « t » de Student et de « F » de Fisher.

Résultats. — Le tableau I indique les valeurs moyennes de la lipémie initiale des abeilles (Co), pour l'ensemble des expérimentations. Par la

TABLEAU I. — Lipémie initiale moyenne (mM) des abeilles naissantes.

Classes analysées :	$\bar{x}$	(N)	s
Phospholipides	2,37	(3)	0,11
Monoglycérides	0,04	(3)	0,01
Acides gras	0,10	(4)	0,06
Stéroïdes	0,16	(3)	0,03
Diglycérides 1-2	0,12	(3)	0,02
Diglycérides 1-3	0,045	(3)	0,022
Triglycérides 1	0,018	(4)	0,008
Tryglycérides 2	0,028	(5)	0,031

Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (s) ont été calculés pour (N) mesures.

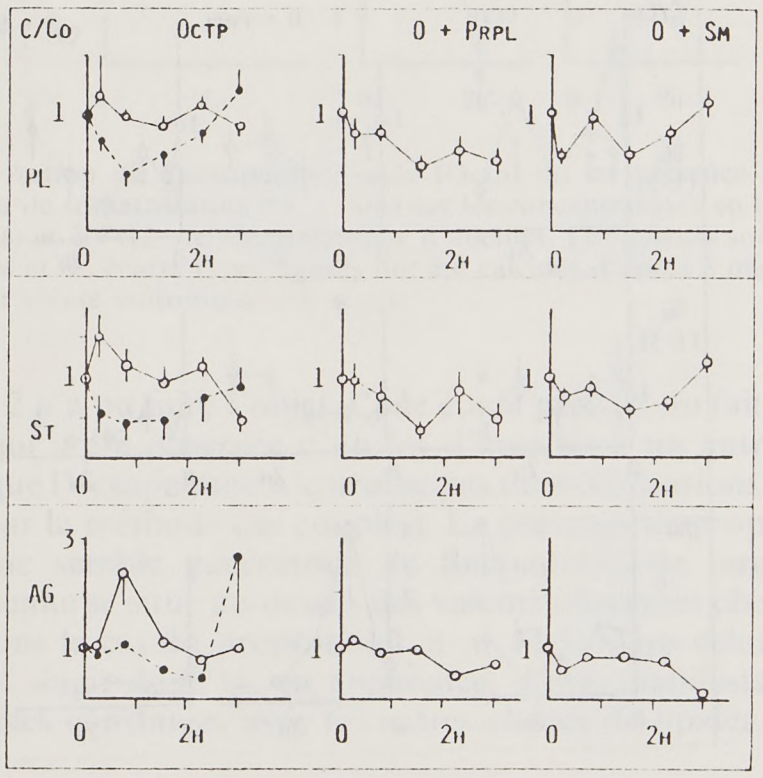


FIG. 1. — Action de l'octopamine seule (Octp) ou en présence de propranolol (O + Prpl) ou de somatostatine (O + Sm) sur les concentrations en phospholipides (PL), stéroïdes (St) et acides gras (AG) de l'hémolymphe d'abeilles. Les valeurs sont exprimées en unités relatives et les écarts-types figurés ont été calculés d'après 3 mesures. Témoins ayant reçu du soluté isotonique : (..●....).

suite, les résultats ont été indiqués en données relatives (C/Co) rapportées à ces valeurs initiales.

La figure 1 présente les résultats concernant les phospholipides, les stéroïdes et les acides gras libres. Les stéroïdes sont augmentés 10 mn ($P = 0,05$) et les acides gras 45 mn ($P = 0,02$) après injection d'octopamine. Le propranolol, comme la somatostatine, suppriment cette augmentation, et rétablissent même le niveau des stéroïdes, numériquement quoique non significativement abaissé ($P = 0,25$) au bout de 3 heures, par l'octopamine.

Les variations des mono et diglycérides sont présentées sur la figure 2. Les monoglycérides ne s'écartent pas, sous l'action de l'octopamine, des valeurs mesurées chez les témoins, sauf au bout de 3 heures. La corrélation entre les deux distributions est de $\rho = + 0,640$ (soit $P = 0,13$ pour $N = 12$). Leur concentration est fortement accrue en présence de propranolol à 45 mn ($P = 0,02$) et abaissée dès les 10 premières minutes, en présence de somatostatine ($P = 0,035$). Les diglycérides 1-2 montrent, 10 mn après injection d'octopamine, un pic ($P = 0,05$), suivi d'oscillations marquées par une hypolipémie compensatrice significative ($P = 0,06$) après 3 heures. Le propranolol et la somatostatine atténuent fortement l'amplitude du phénomène. La variance mesurée sur l'en-

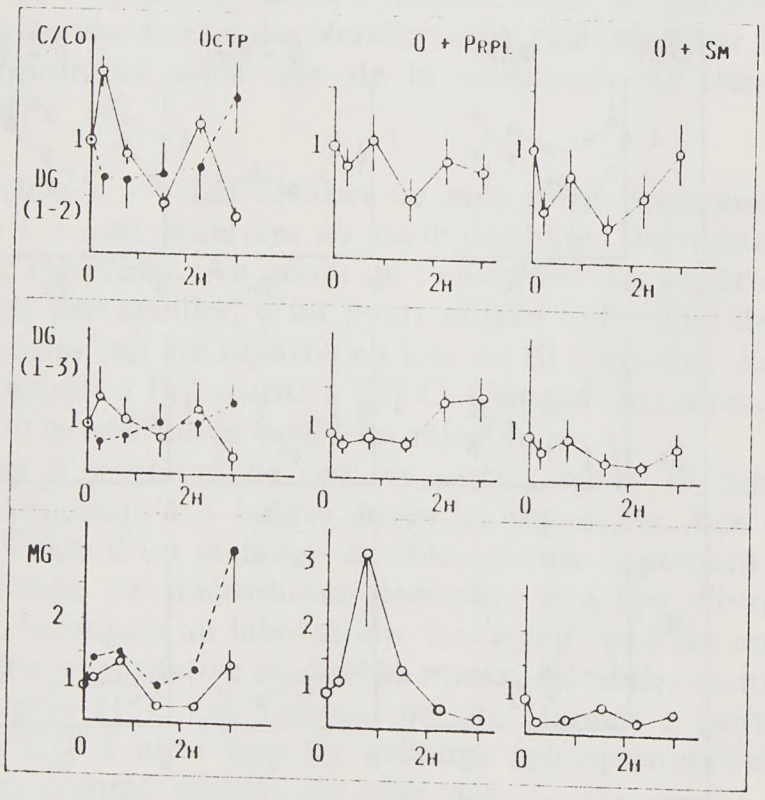


Fig. 2. — Action de l'octopamine seule (Octp) ou en présence de propranolol (O + Prpl) ou de somatostatine (O + Sm) sur les concentrations en diglycérides 1-2 et 1-3 (DG 1-2 et DG 1-3) et monoglycérides (MG) de l'hémolymphe d'abeilles. Les valeurs sont exprimées en unités relatives et les écarts-types figurés ont été calculés d'après 3 mesures. Témoins ayant reçu du soluté isotonique : (..●....).

semble des valeurs (de 0 à 3 heures) est significativement réduite par le propranolol ($P < 0,05$).

Enfin, les variations des triglycérides sont indiquées sur la figure 3. Les principales formes sont abaissées à partir de 45 mn après injection de sérum. La forme 1 (C16 à C20) subit une forte augmentation sous l'action de l'octopamine. Cette réaction est supprimée par le propranolol et, de manière moins nette, par la somatostatine.

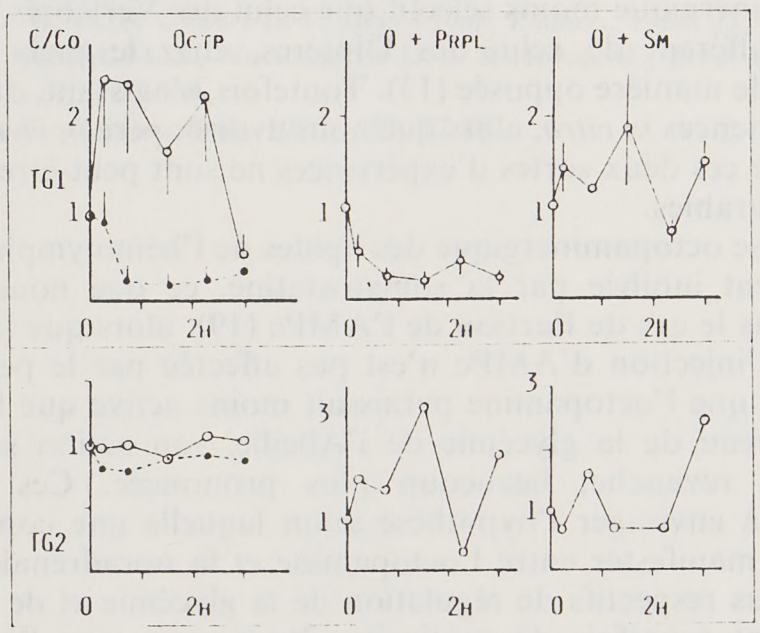


FIG. 3. — Action de l'octopamine seule (Octp) ou en présence de propranolol (O + Prpl) ou de somatostatine (O + Sm) sur les concentrations en triglycérides des formes 1 (TG1) et 2(TG2) de l'hémolymphe d'abeilles. Les valeurs sont exprimées en unités relatives et les écarts-types figurés ont été calculés d'après 3 mesures. Témoins ayant reçu du soluté isotonique : (..●....).

La forme 2 n'a pu faire l'objet d'une étude précise, du fait de la grande variabilité qui a été observée d'un lot d'insectes à un autre. Toutefois, il apparaît que l'octopamine n'entraîne pas de modifications significatives ($P = 0,11$ par la méthode des couples). La présence de propranolol et de somatostatine semble génératrice de fluctuations de large amplitude dont la moyenne se situe au-dessus des valeurs observées chez les témoins (+ 69 % dans le cas du propranolol et + 17 % dans celui de la somatostatine). Il s'agit donc là, en apparence, d'une manifestation de sens opposé à celles constatées avec les autres classes de lipides.

Discussion et conclusions. — L'octopamine injectée à raison de 1 nmole par individu, provoque, chez l'Abeille, une augmentation rapide (10 mn) des concentrations de l'hémolymphe en stéroïdes (+ 106 %), diglycérides (+ 142 %) et triglycérides (+ 104 %), suivie d'une augmentation plus tardive (45 mn) des acides gras libres (+ 131 %).

Ces résultats, qui concordent avec ceux de Orchard et coll. (1981) (7),

contrastent avec ceux observés après injection de noradrénaline chez l'Abeille *in vivo* (Bounias, 1986) (16) et par incubation du tissu adipeux de Diptères en présence d'adrénaline (Bhakthan et Gilbert, 1968) (17).

Dans ces deux derniers cas, en effet, seuls les acides gras libres sont relargués. Le propranolol injecté seul augmente les concentrations des phospholipides, stéroïdes et diglycérides 1-2 chez l'Abeille (9) et abaisse légèrement celles des acides gras libres et des triglycérides. Il semble donc que la présence simultanée, au niveau des récepteurs de l'Abeille, du propranolol et de l'octopamine, neutralise leurs effets respectifs hyperglycémiants et favorise une hypolipémie rapide.

Ces observations tendent à confirmer l'existence, chez l'Abeille, d'un système aminergique moins sélectif que celui des Vertébrés (18), et apparamment différent de celui des Diptères, chez lesquels l'octopamine paraît agir de manière opposée (13). Toutefois, s'agissant, dans ce dernier cas, d'expériences *in vitro*, alors que nous avons opéré *in vivo*, les résultats respectifs de ces deux sortes d'expériences ne sont peut-être pas légitimement comparables.

La réponse octopaminergique des lipides de l'hémolymphe de l'Abeille est également inhibée par la somatostatine, ce que nous avions déjà observé dans le cas de l'action de l'AMPc (19), alors que la réponse des glucides à l'injection d'AMPc n'est pas affectée par le peptide (9). En outre, alors que l'octopamine paraissait moins active que la noradrénaline, au niveau de la glycémie de l'Abeille, son action sur la lipémie s'avère, en revanche, beaucoup plus prononcée. Ces observations conduisent à envisager l'hypothèse selon laquelle une complémentarité pourrait se manifester entre l'octopamine et la noradrénaline, au cours des processus respectifs de régulation de la glycémie et de la lipémie.

Il convient toutefois de souligner, d'une part, que l'interaction de messagers intermédiaires, tels que la GPMc ou l'inositol tri-phosphate, pourrait s'avérer de nature à moduler ces mécanismes et, d'autre part, que nos résultats ont été obtenus avec la DL-octopamine, ce qui ne permet donc pas d'envisager quelle pourrait être la spécificité éventuelle d'action des énantiomorphes. Ces divers points devraient donc faire l'objet de recherches futures.

Bibliographie

1. Mercer A. R., Mobbs P. G., Davenport A. P. & Evans P. D., *Cell. Tiss. Res.*, 1983, *234*, 655-677.
2. Lecomte J., Bourdon V. & Magis N., *Bull. Soc. Roy. Sci. Liège*, 1984, *53*, 317-322.
3. Udenfriend S., Kilpatrick D. L. & Kojima K., *in:* Methods in Biogenic Amine Research. Parvez S., Nagatsu T., Parvez M. & Nagatsu I., eds., Elsevier, p. 1-12.
4. Bounias M. & Pachéco H., *C. R. Acad. Sci.*, 1979, *289 D*, 33-36.
5. Bounias M., *Arch. Internat. Physiol. Biochimie*, 1980, *88*, 93-98.
6. Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1986, *180*, 512-519.
7. Orchard I., Loughton B. & Webb R. A., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1981, *45*, 175-180.
8. Davenport A. P. & Evans P. D., *Insect Biochem.*, 1984, *14*, 135-143.

9. Bounias M., *Biochimie*, 1987, *69*, 655-660.
10. Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1984, *178*, 218-223.
11. Limbird L. E. & Sweat J. D., *in:* The receptors, Academic Press, 1985, p. 281-305.
12. Lafon-Cazal M. & Morandini M., *J. Physiol.*, 1982, *78*, 566-573.
13. Pimley R. W., *J. Insect Physiol.*, 1984, *30*, 587-590.
14. Nakano R., Li S. & Imura H., *Naika hokan*, 1983, *30*, 293-300.
15. Bounias M., *Analusis*, 1981, *10*, 31-35.
16. Bounias M., *Horm. Metab. Res.*, 1986, *18*, 804-810.
17. Bhakthan N. M. G. & Gilbert L. I., *Gen. Comp. Endocr.*, 1968, *11*, 186-197.
18. Smith S. R., Kendall M. J., Worthington D. J. & Holder R., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1983, *16*, 557-560.
19. Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1986, *180*, 77-88.

COMPARAISON DES RELATIONS DOSES/CINETIQUES D'ACTION DU GLUCAGON ENDOGENE ET DU GLUCAGON DE VERTEBRES CHEZ L'ABEILLE

Collaboration avec l'Université
de ULM (RFA) : Prof. Dr. V. MAIER

La partie Allemande procède à son tour aux injections de glucagon endogène, dans les mêmes conditions de doses et d'intervalles de mesures qui ont permis au laboratoire de Biochimie de caractériser l'action du glucagon de boeuf.

Le bilan final des résultats obtenus au laboratoire de Biochimie est indiqué ci-après.

Action du Glucagon de Vertébrés injecté chez l'Abeille in vivo -
(Pr. M. BOUNIAS) $\bar{x} \pm \sigma$ (unités relatives) N=4

Temps après injections (mn)	Doses en ng par abeille					
	0	10	50	100	400	500
Tréhalose :						
0	1,0 ± 0,20	1,0 ± 0,23	1,0 ± 0,37	1,0 ± 0,60	1,0 ± 0,10	1,0 ± 0,30
10	1,01 ± 0,16	1,30 ± 0,17	1,75 ± 0,41	1,30 ± 0,23	1,11 ± 0,11	0,48 ± 0,06 [b]
30	1,18 ± 0,24	1,15 ± 0,13	1,85 ± 0,57	2,04 ± 0,21 [a]	1,12 ± 0,04	0,67 ± 0,26
60	0,87 ± 0,08	0,92 ± 0,26	2,61 ± 0,41 [a]	1,13 ± 0,13		0,77 ± 0,20
90	0,79 ± 0,08	1,29 ± 0,10	1,58 ± 0,48	1,04 ± 0,19	0,79 ± 0,17	0,35 [b] ± 0,09
120	0,75 ± 0,42	0,20 ± 0,07	0,84 ± 0,39	0,90 ± 0,13	1,49 ± 0,27 [a]	1,24 ± 0,20
180	0,90 ± 0,08	0,62 ± 0,05	1,00 ± 0,27	0,54 ± 0,10	0,68 ± 0,08	0,53 ± 0,34

Action du glucagon de vertébrés injecté chez l'Abeille *in vivo* (suite)...

Glucose :

0	1,0 ± 0,37	1,0 ± 0,54	1,0 ± 0,25	1,0 ± 0,37	1,0 ± 0,26	1,0 ± 0,31
10	1,29 ± 0,11	1,35 ± 0,21	3,82 ± 1,25[a]	2,76 ± 0,29[a]	1,43 ± 0,57	0,65 ± 0,11
30	1,83 ± 0,74	0,76 ± 0,07	3,88 ± 1,02[a]	2,59 ± 0,26[a]	1,64 ± 0,25[a]	0,53 ± 0,34
60	1,38 ± 0,08	1,78 ± 0,80	4,05 ± 1,31[a]	1,96 ± 0,75		1,90 ± 0,82
90	0,65 ± 0,08	1,96 ± 0,14[a]	3,99 ± 2,12[a]	4,22 ± 0,69[a]	1,13 ± 0,24	0,95 ± 0,18
120	1,64 ± 0,33	0,48 ± 0,10	4,67 ± 1,50[a]	2,80 ± 0,28[a]	1,70 ± 0,16[a]	1,08 ± 0,92
180	1,33 ± 0,22	1,03 ± 0,09	2,87 ± 0,86	1,88 ± 0,33	1,39 ± 0,25	1,75 ± 0,34

(a) augmentation significative $P < 0,05$ (b) diminution significative $P < 0,05$

Nombre total d'abeilles : 524

Poids moyen : 114,8 ± 2,75 mg par abeille

Glycémies moyennes absolues : { Glc = 5,35 ± 2,45 m M N=5
(Témoins { Tre = 17,0 ± 5,9 m M N=5

Hormone and Metabolic Research

Manuscript Nr. 3655

1) Original (determined for author)
2) Copy for Editor
3) Copy for Co-Editor

Author(s): Jorand, J.P., M. Bounias and R. Chauvin

Title: "The "Survival Hormones": Azelaic and Pimelic Acids, Suppress the Stress Elicited by Isolation Conditions on the Steroids and Phospholipids of Adult Worker Honeybees"

Comment of Reviewer:

"Survivones" = "surival hormones": Azelaic and pimelic acids appear to be a completely new class of hormones in insect endocrinology.

Bees, except wild bees, are animals living in a large community in which with exception of the queen, all individuals are living under extremely strict rules. If one individual is kept isolated for a certain period the lifespan is very restricted. For a long time the idea was the social life might be continued even in the case if some members of the stock were dead and only the images were seen by the other individuals. This interpretation was a decisive error since the group of CHANVIN was able to show that a small piece of cotton impregnated with azelaic and pimelic acid per se restored the lifespan of a completely isolated bee.
In the present paper the authors continued research based on these observations. They were able to show that the dynamics of steroids and phospholipids deviate in isolated bees.
Surprisingly, the introduction of so called surivones restored haemolymph steroids and phospholipids. Therefore the authors conclude that "Survival hormones" act on lipid matebolism. They are **starting** with this experiments **a new chapter of Comparative Endocrinology**.
In a following series of experiments the structures and metabolic fate of these lipids should be elucidated.
The extremely tenacious experimental work showing the way to the new class of survivones is worthy to be published.

Hormone and Metabolic Research

The "Survival Hormones" : Azelaic and Pimelic acids, Suppress the Stress Elicited by Isolation Conditions on the Steroids and Phospholipids of Adult Worker Honeybees.

J.P. Jorand, M. Bounias and R. Chauvin*

Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, BP 91, 84140 Montfavet (France)
* Emeritus Professor in Sorbonne, Le Château, 18380 Ivoy-le-Pré (France)

Summary

The kinetics of abdomen, haemolymph and thoracic-muscle steroid and phospholipid concentrations have been determined in adult worker-bees kept for 0 to 12 hrs starving in darkness, either grouped by 8 (controls) or strictly isolated, or isolated in presence of a piece of cotton impregnated with 1 µg azelaic acid and 1 µg pimelic acid, the so-called "survivones" which restore the lifespan of isolated bees. The dynamics of both steroids and phospholipids strongly deviates in isolated bees relatively to controls. The introduction of survivones completely restored the variations of haemolymph steroids and of haemolymph and thorax phospholipids of isolated bees to exactly similar features as in controls. The action of the lipoic hormones "survivones" thus involves the participation of lipid metabolism.

Running title : survivones action on Honeybees Lipids

Keywords : azelaic, pimelic acids - Phospholipids - Steroids - Honeybees - Haemolymph - Thorax - Abdomen.

Introduction

It has been shown for a long time that the lifespan of the honeybee is much shortened when the insects are kept individually by contrast with bees grouped in appropriate cages (Grassé and Chauvin, 1944). Then, a fourty years lag-time elapsed before Chauvin and co workers (1984) discovered two compounds : azelaic and pimelic acids extracted from whole bodies of bees, that might be at least partly responsible for this "group effect" phenomenon. These compounds are able to lengthen the survival of isolated bees and they have been shown to decrease their rate of respiratory exchanges (Chauvin, Lafarge and Saligot, 1985), by contrast with the isolation conditions, which elicit a stimulation of the thermic liberation (Roth, 1965).

Azelaic (nonane, 1,9 dioic) and pimelic (heptane 1,7 dioic) acids have been recently discovered in the brain of adult worker honeybees (Bounias, Jorand and Chauvin, 1987), and might likely represent a new class of hormone-like compounds named "survivones" by Chauvin (1981).

The aim of the present work was to compare the kinetic variations of some biochemical compounds involved in the energy metabolism, in bees kept up to 12-13 hrs in defined conditions : either grouped, or isolated, in presence of survivones molecules.

Then, provided an isolation stress is put into evidence, the action of survivones could be observed at a biochemical level. Preliminary experiments have shown that no effect was obtained with trehalosemia and only a weak one with glucosemia, whereas a positive response might be expected for haemolymph phospholipids. In the present work, the variations of the steroid and phospholipid fractions have been reported in the three compartments of the body : the abdomen (mainly gut and fatbody) as stock and synthesis organs, the haemolymph as carrying medium, and the thoracic muscles as energy consuming organs.

Materials and Methods

Adult worker honeybees (Apis mellifera, mellifera L.) were collected from the brood combs and pooled by hundreds of individuals in cages.

Batches of 8 bees were separated from the pool in the evening and kept in darkness at 30 ± 1°C overnight. Basic standards were repre-

sented by the original pool. Control series (C) were made with 8 bees gathered together and isolated (I) series with 8 bees kept in separate cages. Lastly, series of 8 isolated bees were kept in cages containing a piece of cotton impregnated with 1 µg of each survivone (I + S). Dark conditions prevented artifacts due to the excitation of bees by the light.

The appropriate number of each series was prepared in order to allow a sample to be collected at 3 hrs intervals from the beginning to à 12-13 hrs delay. About 280 bees were used for the described experiments.

At the defined time intervals, bees were sampled and the haemolymph first collected using Hamilton micro-syringes. Then the abdomens and thoraces were cut off and frozen after weighting. The haemolymph lipids were first extracted in chloroform-methanol (9-1, v/v) and determined by TLC quantitative methods as previously (Bounias, 1986).

The thoracic muscles were then dissected and weighted. Muscles and abdomen lipids were extracted with the same solvent, using Potter homogenizers. The dissection operations took an average 46 ± 7 mn for each series of 8 bees. Duplicate determinations of biochemical parameters were performed from each series.

Sampling operations were thus distributed over a one hour interval and the same order was respected so that the same incubation time was respected for each treatment.

The gut and fat body represent 0.36 times the weight of the abdomen (i.e. 17.7 ± 0.6 mg per bee, from 261 determinations), and the dissected muscles 0.51 times the weight of the thorax (i.e. 16.3±0.6 mg per bee, from 275 estimations).

The significances of the comparisons of means, of correlation coefficient values on one hand and of variances, on the other hand, have been respectively calculated from the equations of Student's "t" and Fisher's "F" distributions.

ρ = correlation coefficients ; b = regression slope ; $\sigma_b^2 = |(b/\rho)^2 - b^2|/N=2$; CV = coefficient of variation ($\sigma/\bar{x}$).

Results

In all cases, isolated bees kept without survivones died after 10 hours in too large number to allow the experiments to be continued up to 12 hours.

The average weights of the abdomen were 51.1 mg (σ = 4.0 mg ; N=56) in pooled bees, 48.3 mg (σ = 7.7 mg ; N=105) in controls grouped by 8 and 48.2 mg (σ = 6.8 mg ; N=100) in isolated bees. The average weights of thoraces were 32.3 mg (σ = 0.7 mg ; N=56) in pooled bees, 31.0 mg (σ = 1.3 mg ; N=111) in controls and 32.1 mg (σ = 1.7 mg ; N=108) in isolated insects. No statistically significant differences could thus be found between isolated and control bees.

The dynamic of haemolymph steroids is illustrated by fig. 1. Large amplitude variations are observed up and down from initial values in isolated bees, whereas similar patterns, with a maximum at 6 hrs and a drop back to the original level at 12 hrs, are observed for both controls and isolated in presence of survivones. Fig. 2 illustrates the strong positive correlation between (I + S) and (C)(ρ=0.90; N=8) (P=0.002 ; b=0.98 $\pm$ 0.25) and the negative one between (I) and (C) (P=0.07 ; N=6) (ρ=-0.77 ; b=-1.2 $\pm$ 0.49).

The kinetics of variations of steroids in the abdomen and thorax of bees are given in tables 1 and 2.

No significant correlation was found in abdomen although the coefficients were weakly negative (ρ=-0.42) and positive (ρ=+0.46) respectively between (I) or (I+S) and controls

By comparison with grouped bees, the amplitude of the variations, as estimated by variances, was much higher in isolated (P=0.017) than in isolated in presence of survivones (P=0.13).

In thorax muscles of controls, the steroid concentrations exhibit a slight increase with time, characterized by a strong positive correlation (ρ=0.87 ; N=5 ; P=0.05) and a low but significant slope : b=0.016 nanomol.mg^{-1}.hour^{-1} (σ = $\pm$0.005 nmol.mg^{-1}.hr^{-1}). The correlation reaches ρ=0.99 (N=4 ; P=0.01) in isolated, where the slope is increased : b=0.047 (σ=0.004) nanomol.mg^{-1}.hour^{-1} .

The variation is significant at P=0.02. In bees isolated in presence of survivones, the correlation turns negative (ρ=-0.73 ; N=5 ; P=0.16) with a slope b=-0.015 (σ=0.008) $n.mol.mg^{-1}.hr^{-1}$. The deviation is significant from controls at P=0.058 and from isolated at P=0.004.

The variations of haemolymph phospholipids are very closely correlated in controls versus isolated with survivones (ρ=0.98 ; N=8 ; P=2.10^{-5}) and not correlated at all in controls versus isolated bees (ρ=0.236; N=6 ; P=0.96) (fig. 3). The kinetics of variations again exhibit a maximum at 6 hrs in controls and isolated with survivones, by contrast with successive deviations up and down from original values in isolated bees.

The variations of phospholipids in thoracic muscles are depicted on fig. 4. A general decrease is observed, but the variations of controls are highly correlated with those of isolated with survivones (ρ=0.987; N=8 ; P=6.10^{-6}) and only poorly with those of strictly isolated bees (ρ=0.73 ; N=6 ; P=0.09).

Table 3 gives the concentrations of abdomen phospholipids. As in thorax, a general decrease is observed. Plotting the concentrations versus L_n of time allows a comparison of the respective decays by linear regression.

In controls, the correlation coefficient is ρ=-0.928 (N=5 ; P=0.02) and the slope b=-11.95 (σ_b = 2.77) $nmol.(L_n\ hr)^{-1}$. In isolated, ρ=-0.946(N=4 ; P=0.054) and b=-16.3 (σ_b=3.9) $nmol.(L_n\ hr)^{-1}$. In isolated with survivones, ρ=-0.901 (N=5 ; P=0.037) and b=-15.4 (σ_b=4.3) $nmol.(L_n\ hr)^{-1}$.

The values of controls remain highly correlated with those of isolated in presence of survivones (ρ = 0.949 ; N=5 ; P=0.014) but much less strongly with those of strictly isolated bees (ρ=0.85 ; N=4 ; P=0.15).

Discussion and conclusions

Looking at the steroid variations in the three compartments of isolated bees it appears that a maximum value is observed in abdomen at 6 hrs, following an important uptake at 3 hrs and followed by a second uptake at 9 hrs. In the same time, haemolymph concentrations vary in the exactly opposite sense ; assuming a total 40 µl haemolymph volume and a total 18 mg organs, the correlation calculation between the total values at 3-6-9 hrs (N=3) gives ρ=0.99990 (P=0.01) and a slope b=-1.16 (σ_b = 0.02) that is an almost equimolar variation. Then, the concentrations in thoracic muscles keep slightly increasing. Haemolymph thus seems to carry from abdomen the appropriate amounts to maintain the thoracic steroid concentrations at a high level. It is noteworthy that in control bees and in isolated with survivones, the observed features are different, leading to respectively constant and decreasing steroid concentrations in thorax, via an exactly correlated dynamic in haemolymph. Abdomen variations were of much lower amplitude in both these two cases (CV = 0.036 and 0.096 resp.) than in strictly isolated (CV = 0.48). The action of survivones thus have spectacularly restored the deviation elicited by the isolation stress.

The variations of abdomen phospholipids exhibit a dynamic of exhaustion, in consistency with the fact that the animals are starving over the whole experimental period. The rate of the decrease is maximum in strictly isolated bees, but not in a significantly different way from those isolated with survivones.

The haemolymph concentrations keep at a rather high level up to 12 hrs but, again, larger amplitude variations occur in isolated bees which significantly deviate from controls whereas normal variations are significantly restored by the addition of survivones.

It seems presently unlikely that the observed variations are under the control of aminergic effectors, as this is the case in vertebrates (Khadzhivanova et al., 1979) since neither noradrenaline nor octopamine (Bounias, 1986-1988) have important effects on phospholipids and steroids.

Steroids are involved as components of lipid-carrier proteins (Chino, 1981) which are present in honeybees as large molecular weight lipo-

phorins with several apolipoproteins (Robbs et al., 1985). But in Vertebrates, they are also known to inhibit glucose transport, by competitive binding on sites of the carriers which are exposed on erythrocyte membranes (Krupka and Deves, 1980).

Although such a mechanism has not yet been studied in Insect, it is likely that steroids are involved at several steps of energy metabolism. Moreover, the central nervous tissues of Insects are able to release steroids, as well as adipose tissues (Fell, Holzhacker and Giannotti, 1976). This would provide the possibility of a close interaction in the site where survivones have been detected.

From another viewpoint, it is noteworthy that steroids are solubilized by phospholipids (Burns and Roberts, 1981) and that both cholesterol and phospholipids are increased in various subcellular fractions when insulin is administered to rats (Khaddzhiivanova et al., 1981). It is thus not suprizing that similar features were observed for these two classes of compounds : significant correlations appear by plotting steroid versus phospholipid concentrations from 3 hrs to 12 hrs in controls (ρ=0.827 ; N=8 ; P=0.01) and isolated with survivones (ρ=0.730; N=8 ; P=0.04) as well as strictly isolated bees (ρ=0.875 ; N=6 ; P=0.02).

Phospholipids are particularly concentrated in Insects red muscles (Novakova, Novak and Kubista, 1976) in correlation with flight, and in connection with the formation of new mitochondrial membranes (Helm et al., 1977). The fact that environmental temperature exert an influence on the mitochondrial lipid composition of flight muscles (Kallapur et al., 1982) might thus play a major part in the fact that our experiments did not lead to similar results at 20°C than at 30°C (Jorand, unpublished). The role of the period of the day at which bees are isolated also has to be more thoroughly elucidated. At the present stage of our investigations, it appears that the effect of survivones is more marked during the night, i.e. at a period where the mortality rate of bees is lower. This phenomenon remains a challenging question, since bees were always kept in darkness, and should be matter of further investigations.

References

Bounias, M. : Noradrenaline, propranolol and adrenochrome interactions with the dynamic of haemolymph lipids in worker honeybees. Horm. Metab. Res. 18: 804-810 (1986).

Bounias. M. : Interaction du propranolol et de la somatostatine avec la réponse octopaminergique de la lipémie de l'abeille in vivo. C.R. Soc. Biol. 182: 37-43 (1988).

Bounias, M., J.P. Jorand, R. Chauvin : Localisation chimique de l'acide azélaïque, facteur de survie des abeilles isolées, dans le cerveau de l'abeille ouvrière. C.R. Acad. Sc. III 304: 79-82 (1987).

Burns, R.A., M.F. Roberts : Cholesterol solubilization by short-chain lecithins : characterization of mixed micelles and cholesterol oxidase activity. Biochemistry 20: 7102-7108 (1981).

Chauvin, R. : La survivone, substance qui induit la survie chez les abeilles isolées. Ins. Soc. 18: 161-172 (1981).

Chauvin, R. : Le mécanisme de l'action des substances de survie des abeilles isolées. C.R. Acad. Sc. (Paris) 299D: 647-650 (1984).

Chauvin, R., J.P. Lafarge, J.P. Saligot : Identification chimique des substances de survie des abeilles isolées. C.R. Acad. Sc. (Paris) 299D: 603-606 (1984).

Chauvin, R. : L'intervention d'une hormone, la survivone, dans la mortalité des abeilles isolées (effet de groupe). Apidologie 16: 77-88 (1985).

Chauvin, R. : Précisions sur le mode d'action des constituants de la survivone des abeilles. Ins. Soc. 32: 209-212 (1985).

Chauvin, R., Y. Girardot : Sur l'organe émetteur de la survivone, hormone de survie des abeilles isolées. C.R. Acad. Sc. (Paris) 301 III: 631-633 (1985).

Chino, H. : Lipid transport by hemolymph lipoproteins. In : R.G.H. Downer, Energy Metabolism in Insects. Plenum Press : 155-167 (1981).

Fell, D., E.L. Holzhacker, O. Giannotti : Chemical study of substances liberated by the central nervous system and adipose tissue of Periplaneta americana L. Arq. Inst. Biol. Sao Paulo 43: 115-120 (1976).

Helm, R., F. Novak, J. Sula, O. Novakova, V. Kubista : Phospholipid metabolism in the flight muscle of Periplaneta americana during maturation. Insect Biochem. 7: 73-76 (1977).

Kallapur, V.L., R.G.H. Downer, J.C. George and J.E. Thompson : Effect of environmental temperature on the phase properties and lipid composition of flight muscle mitochondria of Schistocerca gregaria. Insect Biochem. 12: 115-121 (1982).

Khadzhivanova, N., K. Kumanov, T. Neicheva, T. Dimitrov, G. Georgiev: The role of adrenaline in lung phospholipid biosynthesis. Dokl. Bolg. Akad. Nauk. 32: 993-996 (1979).

Khadzhivanova, N., R. Mincheva, G. Dimitrov, G. Georgiev : Insulin effect on lung subcellular fraction phospholipids and cholesterol. Clin. Respir. Physiol. 17: 53-64 (1981).

Krupka, R.M., R. Deves : Asymmetric binding of steroids to internal and external sites in the glucose carrier of erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta 598: 134-144 (1980).

Novakova, O., F. Novak, V. Kubista : Phospholipid metabolism in red and white insect muscle. Insect Biochem. 6: 381-384 (1976).

Robbs, L., L. Steven, O.R. Ryan, J.O. Schmidt, P.S. Keim, J.H. Law: Lipophorin of the larval honeybee, Apis mellifera L. . J. Lipid Res. 26: 241-247 (1985).

Roth, M. : La production de chaleur chez Apis mellifica. Ann. Abeille 8: 5-77 (1965).

Table 1 - Dynamic of the steroid fraction in the abdomen of honeybees: C = controls ; I = isolated without survivones ; I + S = isolated + survivones. (Means ± SD nanomols per mg).

Time (hrs)	C	I	I + S
0-1	2.42 ± 0.45	2.42 ± 0.45	2.42 ± 0.45
3-4	2.57 ± 0.28	1.59 ± 0.14	1.72 ± 0.14
6-7	2.27 ± 0.35	2.87 ± 0.13	2.29 ± 0.41
9-10	2.63 ± 0.24	1.76 ± 0.17	2.36 ± 0.27
12-13	2.27 ± 0.37	Death	1.87 ± 0.24

Table 2 - Dynamic of the steroid fraction in the thorax of honeybees: C = controls ; I = isolated ; I + S = isolated + survivones (Means ± SD nanomols per mg).

Time (hrs)	C	I	I + S
0-1	0.82 ± 0.07	0.82 ± 0.07	0.82 ± 0.07
3-4	0.90 ± 0.17	1.00 ± 0.21	0.86 ± 0.18
6-7	1.01 ± 0.17	1.14 ± 0.06	0.86 ± 0.23
9-10	1.02 ± 0.06	1.24 ± 0.06	0.80 ± 0.04
12-13	1.00 ± 0.04	Death	0.63 ± 0.04

Table 3 - Dynamic of the phospholipid fraction in the abdomen of honeybees : C = controls ; I = isolated ; I + S = isolated + survivones. (Means ± SD nanomols per mg).

Time (hrs)	C	I	I + S
0-1	73.2 ± 9.3	73.2 ± 9.3	73.2 ± 9.3
3-4	57.8 ± 15.9	29.0 ± 2.1	40.5 ± 3.2
6-7	52.6 ± 4.6	36.2 ± 2.3	51.6 ± 5.6
9-10	33.0 ± 5.8	23.1 ± 2.2	22.8 ± 0.9
12-13	35.8 ± 8.1	Death	21.4 ± 2.9

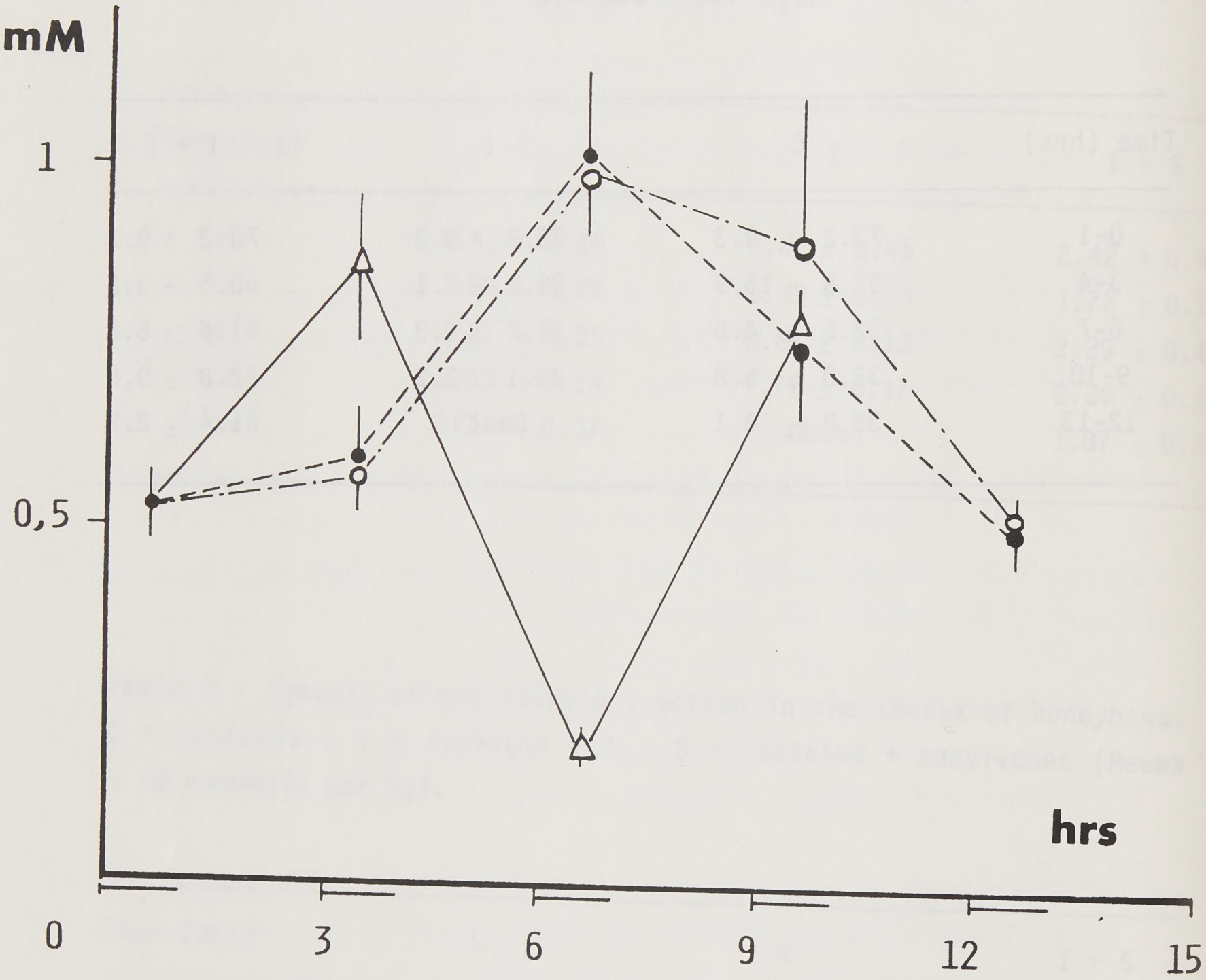


Fig. 1 - Kinetics of haemolymph steroid concentrations in control bees grouped by 8 (--●--), strictly isolated (— Δ —) or isolated in presence of survivones (-·- o -·-). Vertical bars are S.D.

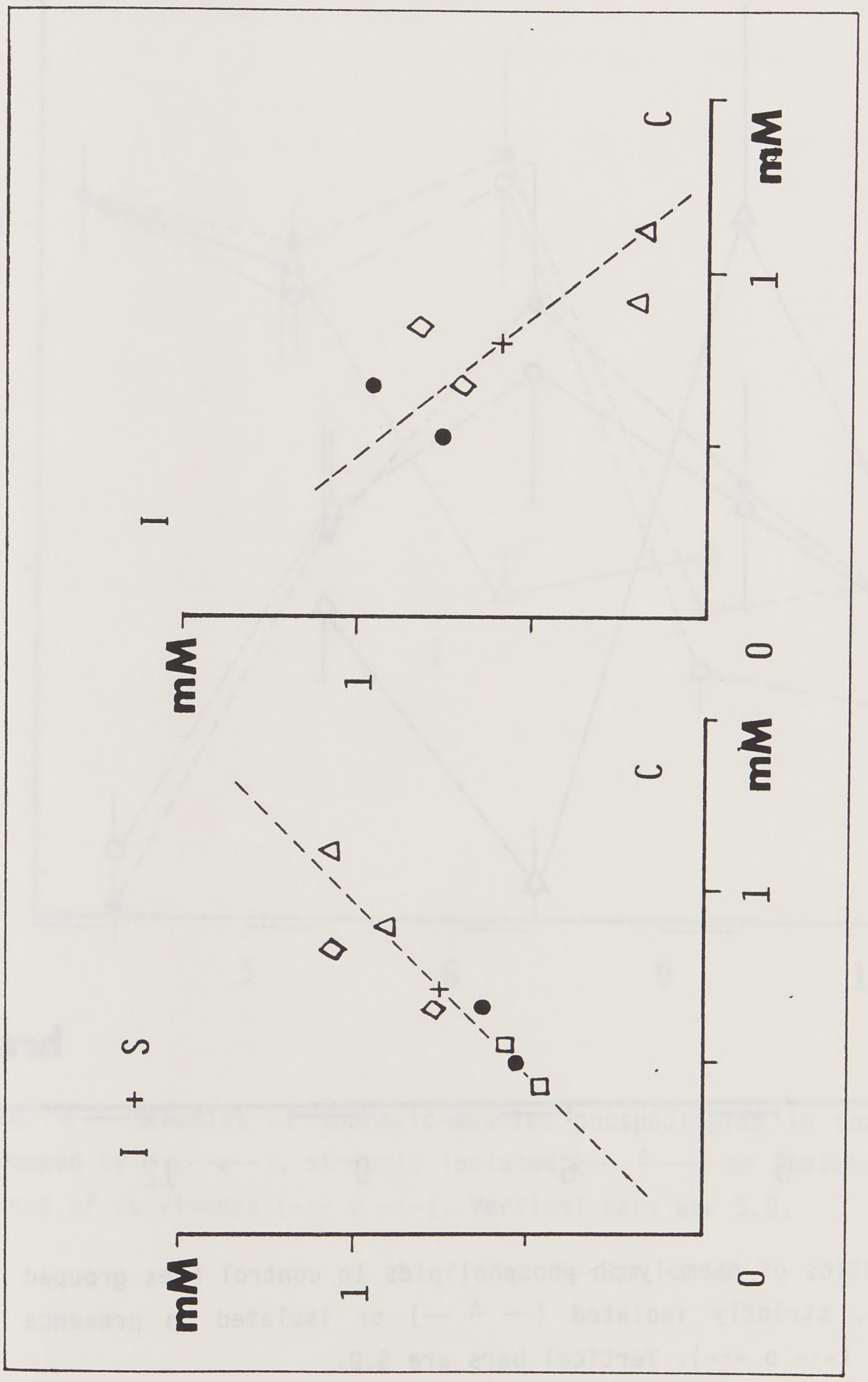


Fig. 2

Fig. 2 - Correlations between haemolymph steroid concentrations in bees isolated with survivones (I+S) (2-A) or strictly isolated (I) (2-B) versus controls (C).

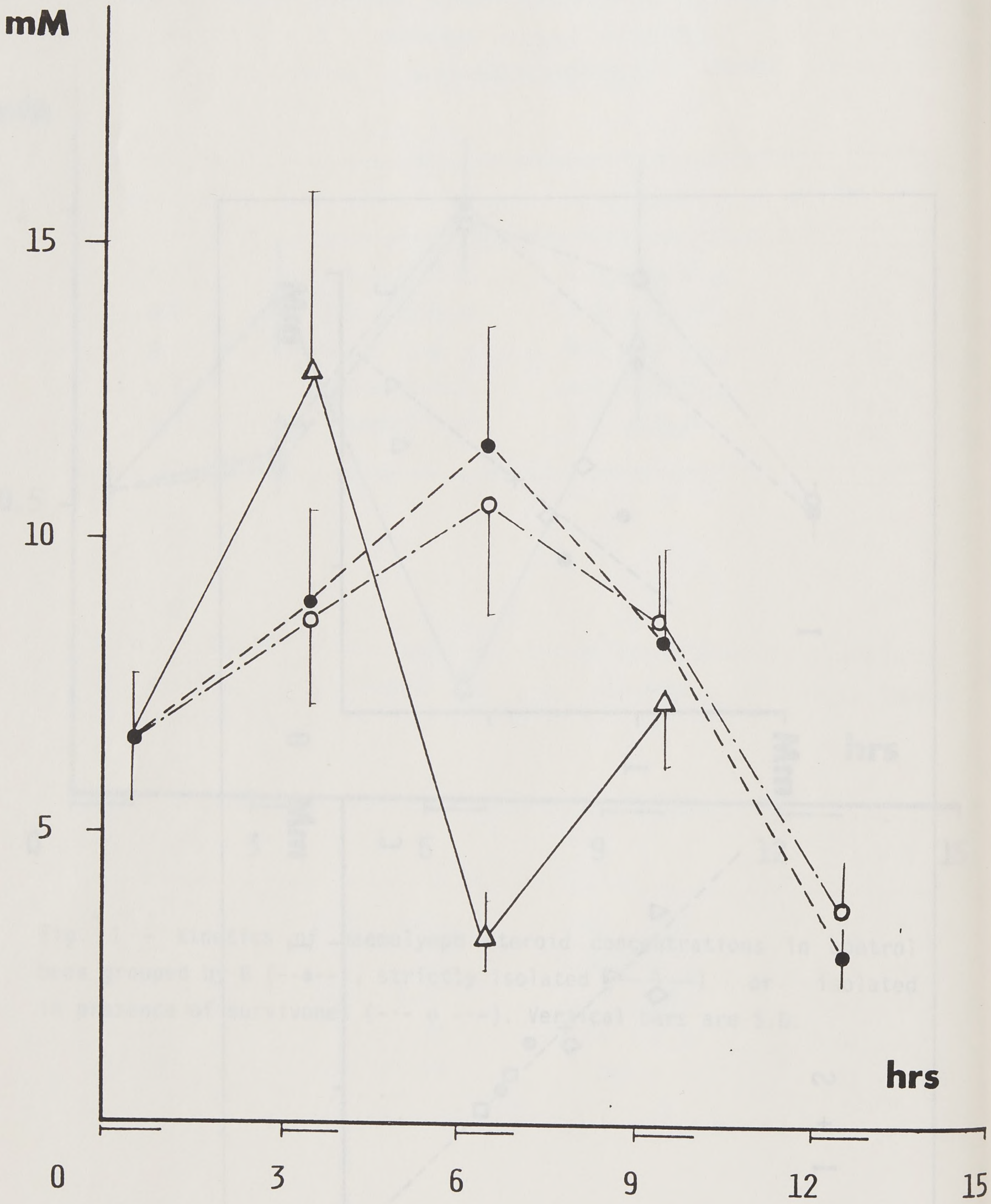


Fig. 3 - Kinetics of haemolymph phospholipids in control bees grouped by 8 (--●--), strictly isolated (— Δ —) or isolated in presence of survivones (-·- o -·-). Vertical bars are S.D.

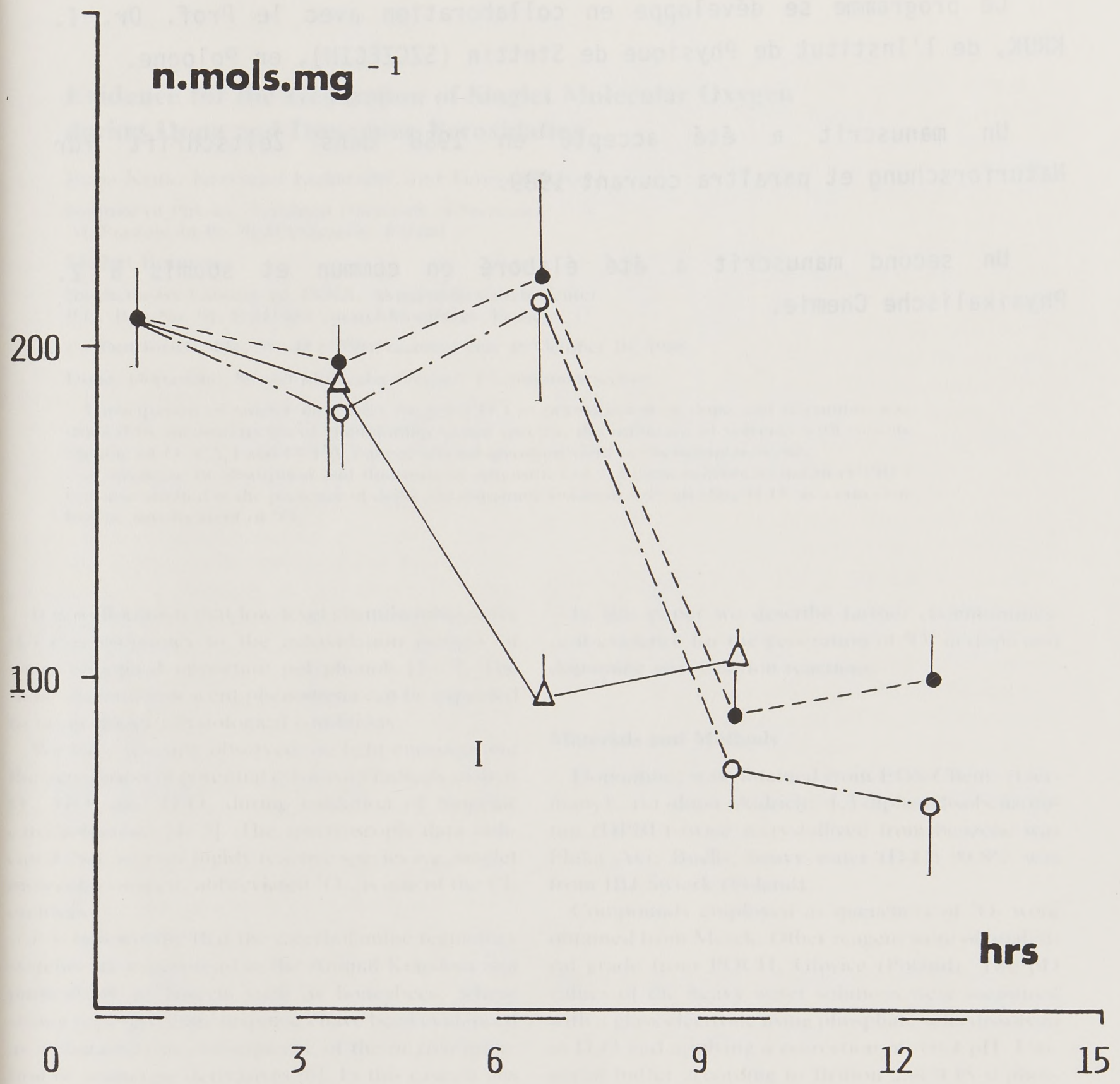


Fig. 4 - Kinetics of thoracic-muscles phospholipids in control bees grouped by 8 (--•--), strictly isolated (— Δ —) or isolated in presence of survivones (-·- o -·-). Vertical bars are S.D. .

B - Physico-chimie de l'autoxidation des hormones aminergiques.

Ce programme se développe en collaboration avec le Prof. Dr. I. KRUK, de l'Institut de Physique de Stettin (SZCZECIN), en Pologne.

Un manuscrit a été accepté en 1988 dans Zeitschrift für Naturforschung et paraîtra courant 1989.

Un second manuscrit a été élaboré en commun et soumis à Z. Physikalische Chemie.

Evidence for the Generation of Singlet Molecular Oxygen during Dopa and Dopamine Peroxidation

Irena Kruk, Krzysztof Lichszteld, and Teresa Michalska

Institute of Physics, Technical University of Szczecin, Al. Piastow 48/49, 70-310 Szczecin, Poland

Michel Bounias

Biochemistry Laboratory, INRA, Avignon Research Center, P.O. Box No. 91, F-84140 Cantarel-Montfavet, France

Z. Naturforsch. **44c**, 39–44 (1989); received July 18/October 10, 1988

Dopa, Dopamine, Singlet Molecular Oxygen, Chemiluminescence

Participation of singlet molecular oxygen ($^1O_2$) in peroxidation of dopa and dopamine was studied by measurements of chemiluminescence spectra, the influence of solvents with various lifetime of O_2 ($^1\Delta_g$) and O_2 ($^1\Delta_g$)-quenchers on quantum yield of chemiluminescence.

A decrease of absorption and fluorescence intensities of 1,3-diphenylizobenzofuran (DPBF) was also studied in the presence of dopa and dopamine oxidized with alkaline H_2O_2 as a criterion for the involvement of $^1O_2$.

It is well known that low-level chemiluminescence (CL) accompanies to the autoxidation process of some biological important polyphenols [1–3]. The same chemiluminescent phenomena can be expected to occur under physiological conditions.

We have recently observed the light emission and the generation of potential cytotoxity radicals such as O_2^-, $HO^\cdot$ and H_2O_2 during oxidation of biogenic catecholamines [4, 5]. The spectroscopic data indicated that another highly reactive species *e.g.* singlet molecular oxygen, abbreviated $^1O_2$, is one of the CL emitters.

It is noteworthy that the catecholamine regulatory systems are widespread in the Animal Kingdom and particularly in Insects such as honeybees, where strong hyperglycemic responses have been evidenced as a characteristic consequence of the *in vivo* injection of aminergic derivatives [6]. In this case, it has been observed that rapid alterations of the injected solutions may occur and result in changes of the hyperglycemic response, involving the quenching of glucose increase and a delay in the trehalose peaking [7]. Obviously, if $^1O_2$ were to be generated in oxidation reactions of the natural aminergic hormones, and come across the regulatory process, then this species as well as their precursors (O_2^-, $HO^\cdot$) would influence the hyperglycemia level.

In this paper we describe further chemiluminescent-evidence for the generation of $^1O_2$ in dopa and dopamine peroxidation reactions.

Materials and Methods

Dopamine, was obtained from EGS-Chem. (Germany); D,L-dopa Aldrich; 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) twice recrystallized from benzene was Fluka AG, Buchs; heavy water (D_2O) 99.8% was from IBJ Swierk (Poland).

Compounds employed as quenchers of $^1O_2$ were obtained from Merck. Other reagent were of analytical grade from POCH, Gliwice (Poland). The pD values of the heavy water solutions were measured with a glass electrode using phosphate salts dissolved in D_2O and applying a correction of +0.4 pH. Universal buffer according to Britton and 0.15 M phosphate buffers were used. The solutions were prepared before experiments in redestilled water.

Chemiluminescence intensity was measured by means of a M12FQC51 photomultiplier with S20 cathode operating jointly with a K-200 recorder (G.D.R.). The quantum yields of CL were determined by the method of Stauff and Schmidkunz [8].

In spite of low quantum yields of dopa and dopamine chemiluminescence, conventional equipment could not be used in order to perform a spectral analysis of the emitted light. Therefore, a set of cut-off filters GOST9411–66 consisting of coloured glass and an EMI9558QB photomultiplier sensitive in the

Reprint requests to Prof. Dr. I. Kruk.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/89/0100–0039 $ 01.30/0

range 180–800 nm cooled to 203 K were used for that purpose according to the method described by Vassiliev [9]. The single photon counting technique was applied. The width of each rectangle is equal to the half spectral width of the difference in transmission of each pair of filters providing one experimental point.

Fluorescence spectra were measured with a Hitachi MPF-3 spectrofluorimeter and fluorescence kinetics with a spectrofluorimeter consisting of monochromators SPM-2, M12FQC51 photomultiplier and K-200 recorder.

The absorption measurements were made using a Zeiss Specord UV-VIS spectrophotometer.

All experiments were done at least in triplicate. Data are reported as the mean ± S.D.

Results

The main criterion for the involvement of $^1O_2$ in chemical and biological systems apart from spectral analysis is a demonstration of an enhancement of chemiluminescence quantum yield ($\emptyset_{CL}$) as well as maximum intensity (I_{max}) in solvent in which $O_2(^1\Delta_g)$ has longer lifetime (τ) than in water [10, 11].

The second very important criterion for the presence of this very reactive species is the inhibition of the above mentioned parameters of CL by the specific quenchers of $^1O_2$ [12, 13]. We have used both criteria as a diagnostic test of the intermediacy of $^1O_2$.

Quantum yields

The autoxidation of alkaline solutions of dopa and dopamine in the presence of molecular oxygen is accompanied by CL. The quantum yields of these reactions were estimated to be about 10^{-12} photons/catecholamine molecule. The addition of H_2O_2 to the above solutions of dopa and dopamine leads to a large increase in the light intensity as well as the quantum yields. Both values have been measured in several solvents, and these values are collected in Table I. The data obtained indicate the increase of luminescence in methanol and ethanol in comparison with water by the factors which correlate with lifetimes of $^1O_2$ in these solvents [10]. In the case of D_2O the observed increase in emission intensity and quantum yield is lower than that expected from the τ_{D_2O}/τ_{H_2O} ratio. These values are clearly destored due to the following factors: D_2O solutions contained more than 0.5% H_2O. The lifetime of $O_2(^1\Delta_g)$ ranges from 3.1 μs in H_2O to approximately 67.0 μs in D_2O [14], so radiationless decay of $O_2(^1\Delta_g)$ is very fast in water. Moreover, the rate constant of the H_2O_2 decomposition is less in D_2O than in H_2O as well as the amounts of formed $^1O_2$ escaping into gas bubbles may be also different in both solvents [10]. This can explain why the observed increase in the CL intensity is not such high as it results from the prolongated lifetime of $^1O_2$ in deuterated solvent.

If the measured emission comes from radiative deactivation of $^1O_2$-dimols the influence of $O_2(^1\Delta_g)$ lifetime (τ) in different solvents on the quantum yield ($\emptyset_{CL}$) could be described by the following expression [15]:

$$\sqrt{\emptyset_{CL}} = \alpha \cdot \tau,$$

where α = const. for a given substrate system.

The plot of $\sqrt{\emptyset_{CL}}$ vs. lifetime of $O_2(^1\Delta_g)$ in the linear scale is represented by a straight line for both investigated systems (Fig. 1). The results of these kinetic experiments confirm the generation of $^1O_2$ as the major light-emitting species.

Table I. The influence of solvents on the maximum intensity (I_{max}) and the quantum yield ($\emptyset$) of chemiluminescence. Conditions: 1 mM dopa, 1 mM dopamine, 0.5 mM $CoCl_2$, 10 mM H_2O_2, ph 11.2, temperature 310 K. Lifetimes of $O_2(^1\Delta_g)$ were taken from [10, 14]. AH denotes dopa or dopamine molecule.

Solvent	τ [μs]	I_{max}		$\emptyset \times 10^{10}$		hv/AH
		Dopa	Dopamine	Dopa		Dopamine
H_2O	3.1 ± 0.3	96 ± 7	236 ± 17	7.3 ± 0.7	78.0 ± 8	
CH_3OH	7.0 ± 0.7	556 ± 21	3066 ± 140	288.0 ± 15	229.0 ± 12	
C_2H_5OH	10.8 ± 1.0	2710 ± 85	25055 ± 1100	1210.0 ± 60	322.0 ± 16	
D_2O	67.0 ± 7.0	296 ± 14	610 ± 53	9.9 ± 1.0	108.0 ± 10	

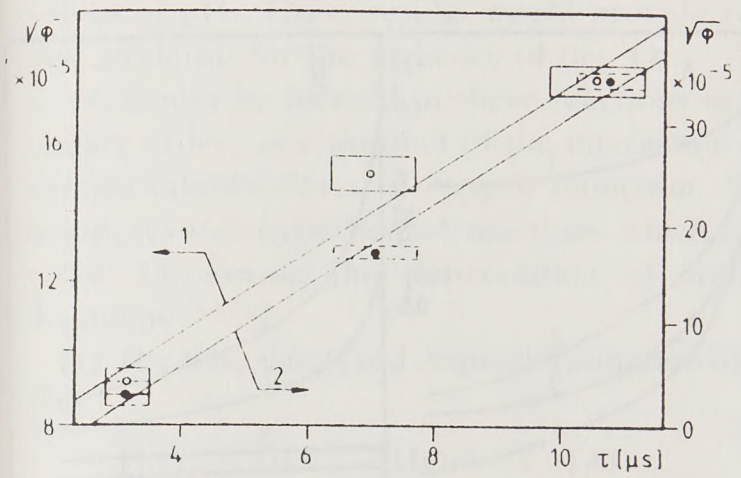


Fig. 1. Plots of $\sqrt{\varphi}$ *vs.* lifetime of solvent for dopamine (1) and dopa (2). Under the same conditions as in Table I. Horizontal segments approximate the experimental errors of lifetimes determination taken from [10, 14]. Vertical segments represent standard deviation (n-5).

Spectral distribution of chemiluminescence

The spectral distribution of CL from dopa and dopamine was measured in different solvents to check the enhancement of $^1O_2$-dimols emission due to the solvent kind (Fig. 2). The spectra are spread through the full visible region and have four emission maxima at around 480–500, 580, 640 and 700 nm. The fluorescence bands of the reaction mixture match only the broad blue-green band of CL spectra (depicted as a dotted line). General properties of CL from dopa and dopamine peroxidation in water and D_2O were described in previous papers [4, 5], and the blue-green bands were attributed to the fluorescence of the dopa and dopamine oxidation products. Also an emission from excited singlet and/or triplet carbonyl-containing products formed during the decomposition of a dioxetane intermediate may also be involved in the 440–560 nm region [16]. As is well known, excited triplet states are strongly quenched by molecular oxygen, this, indeed, was present at large concentration in the investigated reactions. Hence, one can suppose that the contribution of this emitter to the 480 nm band is rather small. The contribution to a total emission of the red light CL bands around 640 and 700 nm depends on the kind of the solvent used and it reaches the greatest value in ethanol. The red bands intensity increase distinctly with lifetime of $O_2(^1\Delta_g)$ in applied solvents. Emission bands at 580, 640 and 700 nm are found to be the luminescence from $^1O_2$-dimols $2\,|^1\Delta_g| \rightarrow 2\,|^3\Sigma_g^-|$. Additionally, a weak CL can participate at 480 nm, which corresponds to the $|^1\Delta_g, {}^1\Sigma_g^+| \rightarrow 2\,|^3\Sigma_g^-|$ transition.

The effect of $^1O_2$-quenchers

In order to elucidate the contribution of $^1O_2$ to the observed CL from our systems, the influence of some

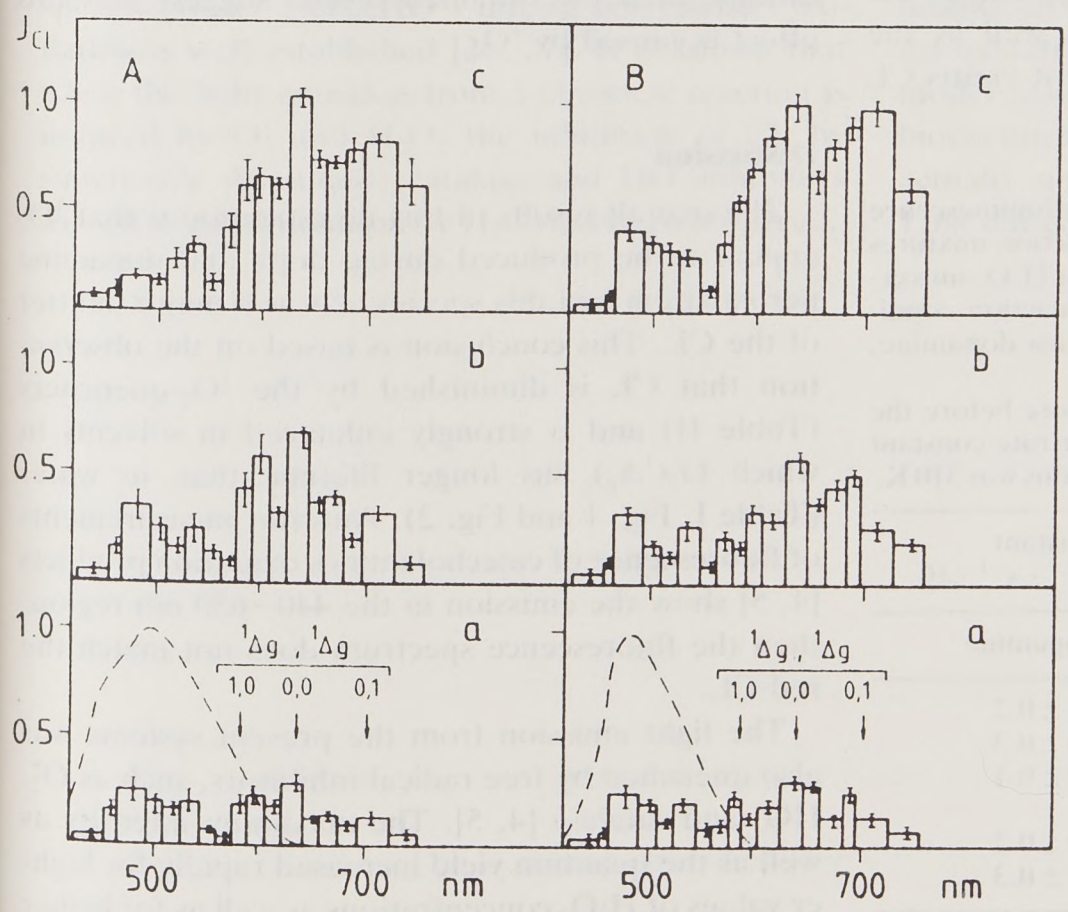


Fig. 2. Spectral distribution of chemiluminescence and fluorescence from the reaction of dopa (A) and dopamine (B) with H_2O_2 in H_2O(a), D_2O(b), C_2H_5OH(c). Experimental conditions as in Table I. The spectra were measured after 20 min from the beginning of dopa and dopamine peroxidation. The height of the rectangle corresponds to the mean value of 10 measurement of the relative intensity. The size of the bars approximates the S.D.

$^1O_2$-quenchers has been investigated quantitatively. The quenchers added to the reaction mixtures reduced the CL intensity and the quantum yield according to the Stern-Volmer equation. The rate constants for the quenching of $^1O_2$-(k_q) are summarized in Table II. The values for k_q determined in this work do not differ significantly from those reported by the other authors [13]. The obvious conclusion is that the quenchers reactivity is similar in each of the investigated systems (with dopa and dopamine), but that the precision for the determination of k_q by our method is not excellent. Other quenchers of $^1O_2$ as DPBF, hydroquinone, tryptofan, also quench clearly CL of dopa and dopamine, but their effect has been studied only qualitatively.

DPBF is widely used as the $^1O_2$ scavenger. Its usage is based on the decrease of the absorption as well as fluorescence due to the oxidation by $^1O_2$ [17]. The rate of disappearance of DPBF was followed by monitoring the decrease in absorption at 415 nm and fluorescence intensity at 458 nm in the presence of different reactants of CL mixture as a function of time (Fig. 3). The rate of DPBF bleaching depends on the presence of particular reactants and it is the highest for the systems exhibiting the greatest values of the maximum intensity and the quantum yield of CL e.g. for the dopa or dopamine + Co^{2+} + H_2O_2 + pH system.

The system of Co^{2+} + H_2O_2 + pH also causes the bleaching of the DPBF absorption as well as the fluorescence quenching of DPBF, since it emitts CL and $^1O_2$ has been postulated as the emitting species [18].

The interaction of DPBF with particular reactants were also investigated spectroscopically. They appeared to be negligible under our experimental conditions, then the obtained results suggest that this effect is caused by $^1O_2$.

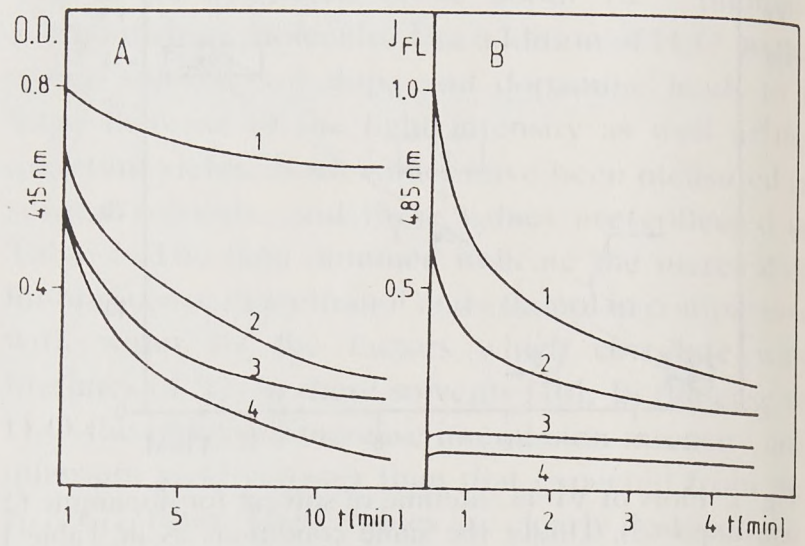


Fig. 3. Changes of absorption (A) and fluorescence (B) intensity during 1,3-diphenylizobenzofurane (DPBF) oxidation in the presence of different substrates combination. Curves: 1-DPBF alone; 2-DPBF + Co^{2+} + H_2O_2; 3-DPBF + Co^{2+} + H_2O_2 + dopamine; 4-DPBF + Co^{2+} + H_2O_2 + dopa. The initial concentrations of DPBF were: 0.1 mM during absorption measurements (A) and 5 μM during kinetics of fluorescence (B). Concentrations of remain substrates: 0.5 mM $CoCl_2$, 10 mM H_2O_2, 1 mM dopa and dopamine. All measurements were performed in universal buffer at pH 10.8. Temperature of solutions was 310 K.

Table II. Effect of $^1O_2$-quenchers on chemiluminescence from dopa and dopamine peroxidation. Reaction mixtures contained: 1 mM dopa, 0.5 mM $CoCl_2$, 10 mM H_2O, universal buffer according to Britton pH 11.2. Reaction conditions for the dopamine, were following: 2 mM dopamine, 0.5 mM $CoCl_2$, 20 mM H_2O_2, 0.5 mM KOH.

Quencher was added to the reaction mixture before the addition of H_2O_2. K_q is the total bimolecular rate constant for deactivation of $^1O_2$. Temperature of solutions was 310 K.

Quenchers	Quenching constant $k_q \times 10^{-8}$ [$M^{-1} \cdot s^{-1} \cdot l$]	
	Dopa	Dopamine
Methionine	2.1 ±0.3	4.1 ±0.2
Histidine	2.8 ±0.3	9.3 ±0.3
Sodium azide	0.9 ±0.2	0.5 ±0.1
5,5-dimethylcyclohexandione-1,3	1.17 ±0.1	0.9 ±0.2
Biliverdine	10.8 ±1.0	9.1 ±0.3

Discussion

The overall results of this investigation is that $^1O_2$ appear to be produced during dopa and dopamine peroxidation and this species acts as a major emitter of the CL. This conclusion is based on the observation that CL is diminished by the $^1O_2$-quenchers (Table II) and is strongly enhanced in solvents in which $O_2(^1\Delta_g)$ has longer lifetime than in water (Table I, Fig. 1 and Fig. 2). Anterior measurements of fluorescence of catecholamines oxidation products [4, 5] show the emission in the 440–630 nm region, then the fluorescence spectrum does not match the red CL.

The light emission from the present systems was also quenched by free radical inhibitors, such as $O_2^{\cdot}$, $HO^{\cdot}$ and catalase [4, 5]. The maximum intensity as well as the quantum yield increased rapidly for higher values of H_2O_2 concentrations as well as for higher

values of pH. These results would provide reasonable evidence for the presence of the $^1O_2$.

$^1O_2$ would be formed in these reactions in a secondary order, as a product of the interaction of the various intermediates of oxygen reduction. We list below several hypothetical reactions which can involve $^1O_2$ during the peroxidation of dopa and dopamine.

(1) The base catalyzed disproportionation of H_2O_2 [19]

$$H_2O_2 + HO^- \rightarrow HOO^- + H_2O$$
$$H_2O_2 + HOO^- \rightarrow H_2O + HO^- + {}^1O_2;$$

(2) the interaction of O_2^- and H_2O_2 in the presence of transition metal ion (M^{n+}) through the modificated Haber-Weiss reaction [20, 21]

$$O_2^- + H_2O_2 \rightarrow HO^- + HO^\cdot + {}^1O_2;$$

(3) the interaction of O_2^- and $HO^\cdot$ [22]

$$O_2^- + HO^\cdot \rightarrow HO^- + {}^1O_2;$$

(4) the interaction of O_2^- and $HO_2^\cdot$ [23]

$$O_2^- + HO_2^\cdot \rightarrow HOO^- + {}^1O_2;$$

(5) the spontaneous and catalyzed disproportionation of O_2^- [24, 25]

$$O_2^- + O_2^- \xrightarrow{+\,2H^+} H_2O_2 + {}^1O_2.$$

The formation of the abovely indicated oxygen species (HOO^-, O_2^-, $HO^\cdot$) during polyphenols oxidation is well established [26, 27]. It is known that when the light emission from a chemical reaction is induced by O_2^- and H_2O_2 the inhibition of CL by superoxide dismutase, catalase and $HO^\cdot$-inhibitors as well as its stimulation by H_2O_2 has been observed.

In our experiments there are two independent possibilities for the generation of the HOO^- ions, namely, the decomposition of the H_2O_2 molecules [19, 28],

$$H_2O_2 + Co(II) \rightarrow Co(III) + HO^- + HO^\cdot$$
$$Co(III) + H_2O_2 \rightarrow Co(II)OOH^- + H^+$$

and a sequence of the following reactions [29]:

$$Co(II) + O_2 \rightarrow Co(III)O_2^-$$
$$Co(III)O_2^- + ArOH \rightarrow Co(III)OOH^- + ArO^\cdot$$
$$Co(III)OOH^- \rightarrow Co(II) + HOO^\cdot$$

where Co denotes cobalt ion, ArOH = dopa or dopamine.

The finding of this work seems to support the idea that there exists the involvement of $^1O_2$ in this emission. One can expect that the same mechanism takes place *in vivo* on nonenzymatic pathway of catecholamines metabolism.

Some doubt may arise from the fact that not all criteria for the presence of $^1O_2$ were applied to the investigated systems. The detection of $^1O_2$ production by observation of monomol CL at 1268 nm and by the ESR which rely on the generation of stable nitroxide radicals upon reaction of $^1O_2$ with sterically hindered amines provide further proofs of this [30, 31]. These techniques are very sensitive tests for $^1O_2$ production especially in biochemical systems. Infrared CL around 1268 nm provides unambiqueous identification of $^1O_2$ because of the absence of interference from other CL emitters generated in biological oxidation reactions. In spite of the fact that our model systems are very simple in comparison to biochemical ones, the detection of $^1O_2$ by the ESR is actually under study, and measurements of CL at 1268 nm is being planned.

[1] D. Sławińska, Photochem. Photobiol. **28,** 453 (1978).
[2] I. Kruk, T. Michalska, and D. Gołębiowska, Bulletin de Liaison No. 8 du Groupe Polyphenols Narbonne, France, Compte-Rendu des Journées Internationales d'Étude et de l'Assemblée Générale 1978, Nancy, 17–19 Mai, 315–326.
[3] D. Sławińska and J. Sławiński, Post. Fiz. Med. **2,** 121 (1986).
[4] I. Kruk, The generation of toxic oxygen radicals and electronical excited products in oxidation reactions of catecholamines, Prace Naukowe Politechniki Szczecińskiej No. 260, Szczecin 1984 (Polish).
[5] I. Kruk, T. Michalska, K. Lichszteld, and M. Bounias, Z. phys. Chemie, Leipzig (submitted for publication).
[6] M. Bounias, Archs. Int. Physiol. Biochim. **88,** 93 (1980).
[7] M. Bounias and I. Kruk, Comp. Biochem. Physiol. **74c,** 143 (1981).
[8] J. Stauff and H. Schmidkunz, Z. Phys. Chem. N.F. **36,** 61 (1963).
[9] R. F. Wassilev, Bioluminescence (Russ.), pp. 170–176, Nauka, Moscov 1965.
[10] D. R. Kearns, Singlet Oxygen, Academic Press, Inc. 1979, pp. 115–137.
[11] M. A. J. Rodgers, J. Am. Chem. Soc. **105,** 6201 (1983).
[12] R. H. Young, D. Brewer, and R. A. Keller, J. Am. Chem. Soc. **95,** 375 (1973).
[13] D. Belus, Singlet Oxygen (B. Rånby and J. F. Rabek, eds.), pp. 61–110, John Wiley and Sons, 1978.
[14] A. A. Krasnovsky jr., Wozbuzhdennye molekuly (Russ.), pp. 32–50, Nauka, Leningrad 1982.
[15] K. Lichszteld and I. Kruk, Prace Naukowe Politechniki Szczecińskiej No. 116, pp. 53–58, Szczecin 1979.
[16] L. Nassi and G. Cilento, Photochem. Photobiol. **37,** 233 (1983).
[17] R. H. Young, K. Wehrly, and R. L. Martin, J. Am. Chem. Soc. **93,** 5774 (1971).
[18] K. Lichszteld, I. Kruk, and T. Michalska, Z. phys. Chemie, Leipzig **260,** 371 (1979).
[19] L. L. Smith and M. J. Kulig, J. Am. Chem. Soc. **98,** February 4, 1976.
[20] F. Haber and J. Weiss, Proc. R. Soc. Lond. A **147,** 332 (1934).
[21] E. W. Kellogg and I. Fridovich, J. Biol. Chem. **250,** 8812 (1975).
[22] J. P. Henry and A. M. Michelson, in: Superoxide Anion and Superoxide Dismutase (A. M. Michelson, J. M. McCord, and I. Fridovich, eds.), p. 283, Academic Press, New York 1977.
[23] B. M. J. Bielski and A. O. Allen, J. Phys. Chem. **81,** 1048 (1977).
[24] A. U. Khan, J. Phys. Chem. **80,** 2213 (1976).
[25] A. U. Khan, J. Am. Chem. Soc. **103,** 6517 (1981).
[26] G. Cohen and R. E. Heikkila, J. Biol. Chem. **249,** 2447 (1974).
[27] D. C. Borg, K. M. Schaich, J. J. Elmore jr., and L. A. Bell, Photochem. Photobiol. **28,** 887 (1978).
[28] A. Bakac, J. H. Espenson, I. I. Creaser, and A. M. Sargeson, J. Am. Chem. Soc. **105,** 7624 (1983).
[29] A. Nishinaga, T. Itahara, T. Shimzu, H. Tomta, K. Nishizawa, and T. Matsura, Photochem. Photobiol. **28,** 687 (1978).
[30] J. R. Kanofsky, Photochem. Photobiol. **47,** 605 (1988).
[31] E. Cadenas and H. Sies, Methods Enzymol. **105,** 221 (1984).

LUMINESCENCE IN THE REACTION OF DOPA WITH HYDROGEN PEROXIDE

Irena Kruk, Teresa Michalska and Krzysztof Lichszteld

Institute of Physics, Technical University of Szczecin, Al. Piastów 48/49, 70-310 Szczecin, Poland

Michel Bounias, Biochemistry Laboratory, INRA, Avignon Research Center, P.O.Box n° 91, F84140 Cantarel-Montfavet, France.

Introduction

In our previous paper |1| we have reported that the peroxidation of 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) is accompanied by chemiluminescence (CL). All the evidence indicates that singlet molecular oxygen ($^1O_2$) is one of the CL emitters |2|.

It is worthwile to remind that the generation of electronically excited higly reactive species during DOPA oxidation may influence considerable the biochemical processes occuring in cells |3|.

The present paper is devoted to the investigation of the peroxidation mechanism for DOPA and the identification of light emitting species appearing in this process.

Experimental

D,L-dopa (3,4-dihydroxyphenylalanine), 1,4-diazobicyclo-|2,2,2|-octane (DABCO) were obtained from Aldrich; 1,3-diphenylisobenzofurane (DPBF) twice recrystallized from benzene was Fluka AG, Buchs; mannitol from Difco Lab. Detroid; urea and thiourea from Merck, cysteine, glutathione reduced and alanine from Reanal (Hungary); SOD (EC 1.15.1.1) from bovine

erytrocytes (3300 units/mg protein activity), was purcha from Sigma, catalase from bovine liver with about 3000 un Bergmayer'a/mg protein activity. L-lactic dehydrogenase (about 300 units/mg). I.B. and BAM Wrocław (Poland); cry talline haemin and pig heart cytochrome c from Biomed, Cracow (Poland); 99.75 % heavy water (D_2O) from I.B.J.; Świerk, Warsav. Other reagent, were of analytical grade POCH, Gliwice (Poland). The solutions were prepared befo experiments in redestilled water. Universal buffer accor to Britton and 0,15 M phosphate buffers were used.

Chemiluminescence intensity was measured by means of M12FQC51 photomultiplier with S20 cathode operating joint with a K-200 recorder (G.D.R). The temperature was 310 K. The quantum yields of CL were determined by the method of Stauff and Schmidkunz |4|. Measurements of CL spectra wer carried out by employing a set of calibrated glass cut-of filters GOST9411-66 and an EMI9558QB photomultiplier sens tive in the range 180-800 nm cooled to 203 K, by the meth described by Vassiliev |5|. The single photon counting te nique was applied. The width of each rectangle is equal t the half spectral width of the difference in transmission of each pair of filters providing one experimental point.

Fluorescence spectra were measured with a Hitachi MPF spectrofluorimeter and with a spectrofluorimeter consisti of monochromators SPM-2, M12FQC51 photomultiplier and K-20 recorder.

Absorption spectra were estimated with a Zeiss Specor UV-VIS spectrophotometer.

Results and Discussion

Aqueous solutions of DOPA saturated with air or molecular oxygen undergo autoxidation to melanin. Chemical degradation as well as the anodic oxidation of DOPA were studied |6-9| and the sequence of oxido-reduction reactions was proposed as follows (Fig. 1). DOPA (I) is oxidized by the liberation of two protons and two electrons to 3.4-quinone phenylalanine (II). The product II is reduced by a dismutation to 2.3-dihydro-5.6-dihydroxyindoline-2-carboxylic acid (III). In the next stage the latter product (leucodopachrome) is oxidized to 2.3-dihydro-5.6-quinone-2-carboxylic acid called dopachrome (IV). The dopachrome undergoes rearrangement and decarboxylation being converted partly into 5.6-dihydroxyindole (V) and into 5.6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (VI). The latter product predominates under acidic conditions. By a renewed oxidation, compound V is oxidized with the formation of indole-5.6-quinone (VII) which undergoes polymerization giving melanins (VIII) which is the end product.

Some of the steps in the proposed model for the transformation of DOPA proceed with the generation of light emitting species. General properties of the chemiluminescence (CL) accompanying the oxidation of DOPA with molecular oxygen and H_2O_2 were described in our previous paper |1|.
The total quantum yields of CL were found to be of the order of 10^{-9} - 10^{-8} photons/molecule of DOPA. It was established that the rate of DOPA peroxidation as well as the quantum yield depend on the presence and kind of catalysts, H_2O_2 con-

centration, temperature and pH.

The values of the quantum yields, found in this pa increased rapidly for the higher values of pH (up to 11 (Fig. 2). This increase can be ascribed to the ionizati of both the OH-groups of the phenolic ring as well as o the H_2O_2 molecules. The catalytic decomposition of H_2O_2 results in the formation of $HO_2^{\cdot}$ or $O_2^{\cdot-}$ radicals |10|. DO and the products of its oxidation undergo protonation a the nitrogen atom |11| what can also explain such a pH dependence. The above processes control both the DOPA ox dation reaction and the light emission.

In order to identify the emitting species the abso ion changes, fluorescence and chemiluminescence spectra re also measured.

Absorption spectra of the peroxidation products of DOPA recorded at different times of the reaction course are presented in Fig. 3. Aqueous solution of DOPA alone shows absorption with a maximum at 280 nm which decrease rapidly during DOPA oxidation in these conditions. A new absorption bands in the ultraviolet and visible regions with maxima at about 305 and 480 nm then appear (Fig. 3A corresponding to the dopachrome. The formation and decre ase of dopachrome were substantially delayed at pH 7.4 (Fig. 3B). Additionally, these bands are broaded by the absorption of a dimer corresponding to a mixture of 5.6- dihydroxyindole and indole-5.6-quinone or oligomers |8,1 An increase of the absorption at 262 nm indicates the fo mation of 5.6-dihydroxyindole |8,13|. The overlap of the

bonds corresponding to the peroxidation products demonstrates that several products are formed and consumed during DOPA peroxidation reaction.

Owing to the strong lability of basic solutions of dihydroxyindoles and their degradation products |14|, particularly in the presence of H_2O_2 as an oxidant, the formation of melanine was also observed.

Fluorescence spectra of the spent reaction mixture of DOPA peroxidation reveal bands intensities and λ_{max} of which change with the reaction time and depend on λ_{exc} (Fig. 4). During the excitation with λ = 320 nm a blue fluorescence appears. The emission spectrum covers the range from 330 to 600 nm with the strong main maximum at 405 nm and very weak one at 460 nm (Fig. 4A). The latter band has its λ_{exc} to the longwave range shifted (Fig. 4B). When the fluorescence was recorded during λ_{exc} = 410 nm a new band with a maximum at about 505 nm appears (Fig. 4C).

DOPA does not fluorescence in the spectral range 330-630 nm (it reveals a violet fluorescence with maximum at 315 nm).

Values of $\Delta\tilde{\nu}_{1/2}$ of the bands at 405 nm (λ_{exc} = 366 nm) vary from 4000 to 6700 cm^{-1} depended on the reaction time for 3 and 20 min. respectively. Similarly, the values of $\Delta\tilde{\nu}_{1/2}$ change with λ_{exc} and are as follows: 4800 cm^{-1} (λ_{exc} = 220 nm), 6700 cm^{-1} (λ_{exc} = 366 nm) and 4900 cm^{-1} (λ_{exc} = 410 nm).

These facts imply, that above mentioned bands belong to intermediate products of DOPA peroxidation which are formed and consumed in the course of the DOPA oxidation what means that at least three emitting species are formed.

Taking into account the mechanism of DOPA degradation and the previously reported data dealing with indoles fluorescence |15-17| the most likely explanation for the 400 nm emission appears to be $^1S \rightarrow S_o$ transitions in excited 5.6-dihydroxyindole molecule. This band was decreasing during the reaction course and was replaced by a fluorescence in blue-green region with maxima at 460 and 505 nm. The band at 460 nm can be attributed to the products of indole oxidative degradation resulting from the pyrrole ring opening reaction |18,19|. The emission with maximum at 505 nm may appear to be resulting from exciplex formation between excited 5.6-dihydroxyindole and the other product of the reaction mixture, as the ability of participation of indole compounds in the formation of exciplex is well known |20,21|. The first case of the generation of exciplex, by a way other than radical ion reaction, probably by the dioxetane route has been reported |17|.

The spectral distribution of the CL accompanying the DOPA peroxidation in H_2O and D_2O as solvents is shown in Fig. 5.

Both spectra reveal four emission maxima at around 480-500, 580, 640 and 700 nm. The red CL bands at 640 and 700 nm give a greater contribution to the total emission in D_2O than in H_2O. Comparing the CL spectra with the fluorescence one can notice that the broad bluegreen band with maximum at 480-500 nm can be attributed to the fluorescence of the DOPA oxidation products.

The position of the bands with maxima at 580, 640 and 700 nm corresponds to the simultaneous transition in singlet

oxygen dimols |22,23|:

$$2\ O_2\ |^1\Delta_g| \longrightarrow 2\ O_2\ |\ ^3\Sigma_g^-\ |\ ,$$

with a vibrational quantum number of (1,0) for 580 nm (0,0) for 640 nm, and (0,1) for 700 nm, as shown in the upper part of Fig. 5. It is not yet sure enough if the 580 nm band may be observed in aqueous solutions |23|. Another interpretation of this band is that this emission is a weak phosphorescence of an unknown product. It is possible because a high sensitivity of the single photon counting method was applied to measure the CL spectrum. A more sophisticated research on the fluorescence and phosphorescence properties of DOPA degradation products are needed to make this interpretation unambiguous. The involvement of $^1O_2$ in the observed CL was confirmed using the $^1O_2$ dimol emission-quenchers and solvents in which this molecule has a longer lifetime than in water |2|.

The question arisse as to what elementary reactions generate emitters of the observed chemiluminescence. The suggested mechanisms involved in blue-green bands of CL are shown in Fig. 6.

Mechanism I proposed by Sugiyama et al. |18,19,24| includes the formation of a dioxygenase type reaction at $C_2{=}C_3$ bond with the generation of 1.2-dioxetane as the intermediate which then decays with the breaking of the C-C and O-O bonds and the formation of carbonyl-containing products in the excited state.

The indole nucleus is not necessary for the formation of excited states as shown by the emission in the case of catechols |25|. It may follow with the participation of se-

miquinone, since the electron density is also very small at the C-5 and C-6 atoms (C_5-C_6 bond is very weak). These atoms are susceptible to a nucleophilic attack of HOO^-, $O_2^{\cdot-}$, $^1O_2$ and subsequent formation of the dioxane ring. The decomposition of intermediate peroxides leads to the formation of excited carbonyl products |24-27|.

The final steps of the above reactions release about $\Delta H = -270\ kJ \cdot mol^{-1}$ and $\Delta H = -250\ kJ \cdot mol^{-1}$ for I and II mechanisms, respectively. These amounts of energy (ΔH) are sufficient to excite carbonyl products to their lowest triplet and singlet states |24|. Moreover, a large decrease in the pH values (1.4 units) measured 15 min after the start of peroxidation reaction: 1 mM dopa + 5 mM $CoCl_2$ +10 mM H_2O_2, pH 11.2 confirms the generation of products with carboxylic groups. The amount of energy liberated in these reactions is too low to excite the ^1S state of 5.6-dihydroxyindole (λ_{exc} = 320 nm, λ_{em} = 400 nm) therefore, the band at 405 nm in the fluorescence spectrum is not presented in the CL spectrum. The quinonic products of DOPA oxidation do not exhibit fluorescence, since the fluorescence spectra indicate extensive decomposition of the indole.

In the light of the spectroscopic data and the low quantum yield of CL one may be conclude that CL process is only a small fraction of the total chemical change.

The reactions generating activated oxygen species such as HOO^-, $O_2^{\cdot-}$, $HO^{\cdot}$ and $^1O_2$ during peroxidation of DOPA were discussed in our previous paper |2|. If the above molecules are initiators or rate limiting agents in the process of the DOPA peroxidation, then the presence of free radical scavengers, $^1O_2$ - quenchers and catalase should decrease

the maximum light intensity. The results of our experiments are given in Table 1. It can be seen, from this table, that the ability of the CL reduction by these reagents correlates at least qualitatively, with the rate constants for their reaction with $HO^{\cdot}$, $O_2^{\cdot-}$ radicals and with $^1O_2$-quenching rate constants. Urea which react poorly, if at all, with $HO^{\cdot}$ radicals has little effect. Apart of this, strong inhibiting effect of catalase (Fig. 7) as well as the quenching influence of 0.1 mM cystyne (45 ± 5%), 0.1 mM L-ascorbic acid (20 ± 4%) and 1 mM α-naphtol (15 ± 3%) was also observed.
The addition of phenolic inhibitors to the reaction mixtures diminished the CL sharply and after reaching the minimum intensity it increased again as the inhibitors were cousumed.
It is evident from the data in Table 1 and Fig. 7 that SOD and catalase are very efficient quenchers of DOPA chemiluminescence. These results show that $O_2^{\cdot-}$, HOO^- ions are involved in the reactions determing excitation stages. Similarly, addition of free radicals scavengers (α-naphtol, ascorbic acid) can scavenge the semiquinone radicals.

In conclusion, we suggest here, that (i) the light emission follows the dopachrome formation and the degradation of the quinonoid ring and/or the pyrrole one with the participation of $O_2^{\cdot-}$, HOO^-, HO^-, O_2, (ii) the oxidation of DOPA to dopachrome by O_2 and H_2O_2 is the rate-controlling step in the light emission,(iii) at least two CL emitters are generated, and (iv) the singlet oxygen is one of the CL emitters.

Table 1. Effect of $HO^{\cdot}$, $O_2^{\cdot-}$ inhibitors and $^1O_2$-quenchers on the chemiluminescence of DOPA

Solvent	Quencher	Quenching $\frac{I_o - I}{I_o} \times 100\%$	Rate constant for scavenger reaction ($M^{-1}.s^{-1}$)
			$HO^{\cdot}$
H_2O pH 11.2	10 mM mannitol	34.0±4.1	1.0×10^9
	1 mM thiourea	43.0±3.2	4.7×10^9
	1 mM urea	0	7.0×10^5
	2 mM sodium formate	26.5±5.0	2.7×10^9
	1 mM cysteine	70.6±5.2	8.0×10^9
	1 mM glutathione (red.)	63.4±4.6	8.0×10^9
	500 µg/ml L-lactic dehydrogenase	52.5±3.9	2.1×10^{11}
			$O_2^{\cdot-}$
	80 µg/ml SOD	93.8±3.9	2.4×10^9
	1 mM imidazol	0	0.02
			$^1O_2$
pH 7.2 $H_2O:CH_3OH$ (1:1)	1 mM alanine	11.2±1.8	2.0×10^6
	10 mM DABCO	14.5±2.1	7.3×10^{-6}
	1 mM DPBF	30.0±4.2	1.3×10^9 CH_3OH
H_2O	1 mM hydroquinone	33.5±3.9	7.0×10^7 $C_6H_6:CH_3OH$ (4:1)
	5 mM tryptophan	57.0±6.1	4.0×10^7

Reaction mixtures contained: 1 mM DOPA, 0.5 mM $CoCl_2$, 10 mM H_2O_2. Quenchers were added 15 min. after the start of reaction. Abbreviations used: I_o - maximum intensity chemiluminescence without quencher, I- maximum intensity with quencher; SOD-superoxide dismutase, DABCO-1.4-diazabicyclo-2.2.2-octane; DPBF-1.3-diphenylisobenzofuran. The radical rate constants and rate constants of $^1O_2(^1\Delta_g)$ quenching were taken from the compilation |28,29|.

REFERENCES

1. Kruk I., T.Michalska and K.Lichszteld: XIVth International Conference of The Groupe Polyphenols, August 15-18, 1988 St. Catharines, Ontario, Canada (submited for publication).

2. Kruk I., K.Lichszteld, T.Michalska and M.Bounias: Z. Naturforschung (submited for publication).

3. Cadens E. and H.Sies: Methods Enzymol. 105 (1984),221.

4. Stauff J. and H.Schmidkunz: Z.Phys.Chem. N.F. 36 (1963),61.

5. Vassilev R.F.: Bioluminescence (Russ) Nauka, Moscov 1965 pp. 170-176.

6. Raper H.S.: Biochem.J.21 (1927), 89.

7. Mason H.S. and C.J.Wricht: J.Biol.Chem. 180 (1949),235.

8. Swan G.A.: Structure, Chemistry, and Biosynthesis of Melanins in:Progress in the Chemistry of Organic Natural Products Wien-Springer-Verlag-New York 1974, 522.

9. Rice M.E. and B.Moghaddam: Anal.Chem. 59 (1987),1534.

10. Bielski B.H. and A.O.Allen: J.Phys.Chem. 81 (1977), 1048.

11. Bridges J.W., and R.T.Williams: Biochem.J. 107 (1968),225.

12. Mayaudon J., M.El.Halfawi, and L.Batistic: J.Soil Science, 24 (1973), 188.

13. Mason H.S.: Structure of Melanins. In: M.Gordon (Ed.): Pigment Cell Biology, 563. New York: Academic Pres. 1959.

14. De Mol N.J., G.M.J. Beyersbergen van Henegouven, and K.W. Gerritsma: Photochem. Photobiol. 29, 1979,7.

15. Van Duuren, B.L.: Chem. Rev. 63 (1963) 4,325.

16. Bridges J.W. and R.T.Williams: Biochem. J. 107 (1968),22

17. Duran N., K.Zinner, R.C.De Baptista, C.C.Vidical and G.Cilento: Photochem. Photobiol. 24 (1976),383.

18. Sugiyama N., M.Akutagawa, T.Gasha; Yo Saiga and H.Yamamot J.Chem. Soc. Japan 40 (1967),347.

19. Sugiyama N., M.Akutagawa, and H.Yamamoto: Bull,Chem.Soc. (Japan) 41 (1968),936.

20. Longworth J.W.: Photochem.Photobiol. 7 (1968),587.

21. Davidson R.S., A.Lewis and T.D.Whelan: J.C.S.Chem.Comm. 1975, 203.

22. Khan A.U. and M.Kasha: J.Am.Chem.Soc. 92 (1970),3293.

23. Khan A.U.: Photochem.Photobiol. 28 (1978),615.

24. Neidl C. and J.Stauff: Z.Naturforsch 33b (1978),763.

25. Kruk I.: "The Generation of Toxic Oxygen Radicals and Electronical Excited Products in Oxidation Reactions of Catecholamines". Prace Naukowe Politechniki Szczecińskiej No.260, Szczecin, 1984 (Polish).

26. Senoh S., H.Kita and M.Kamimoto: In: Biological and Chemical Aspects of Oxygenases, Ed.K.Bloch and O.Hayaishi, Maruzen, Tokyo 1966 p. 378.

27. Hamilton G.A.: In:Molecular Mechanisms of Oxygen Activatio (Ed. O.Hayaishi) Academic Press. New York 1974, p.405.

28. Bartosz G.: Zagadnienia Biofizyki Współczesnej 6 (1981),5.

29. Bellus D.: In:"Singlet Oxygen", Eddited by B.Rănby and J.F.Rabek John Willey and Sons, 1978, pp. 61-110.

SUMMARY

This study was undertaken to establish the mechanism of chemiluminescence (CL) in the oxidation reaction of DOPA by H_2O_2. The spectral distribution of chemiluminescence and fluorescence as well as quantum yields of CL were measured. The effect of the superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($HO^{\cdot}$) - inhibitors, singlet oxygen ($^1O_2$) - quenchers and catalase exerted on the light emission was also studied. The CL spectrum revealed four emission bands with maximum at around 480-500, 580, 640 and 700 nm. The bands at 580, 640 and 700 nm were similar to those for $^1O_2$.

The results indicate that at least two CL emitters are generated during peroxidation of DOPA and that one of them is $^1O_2$.

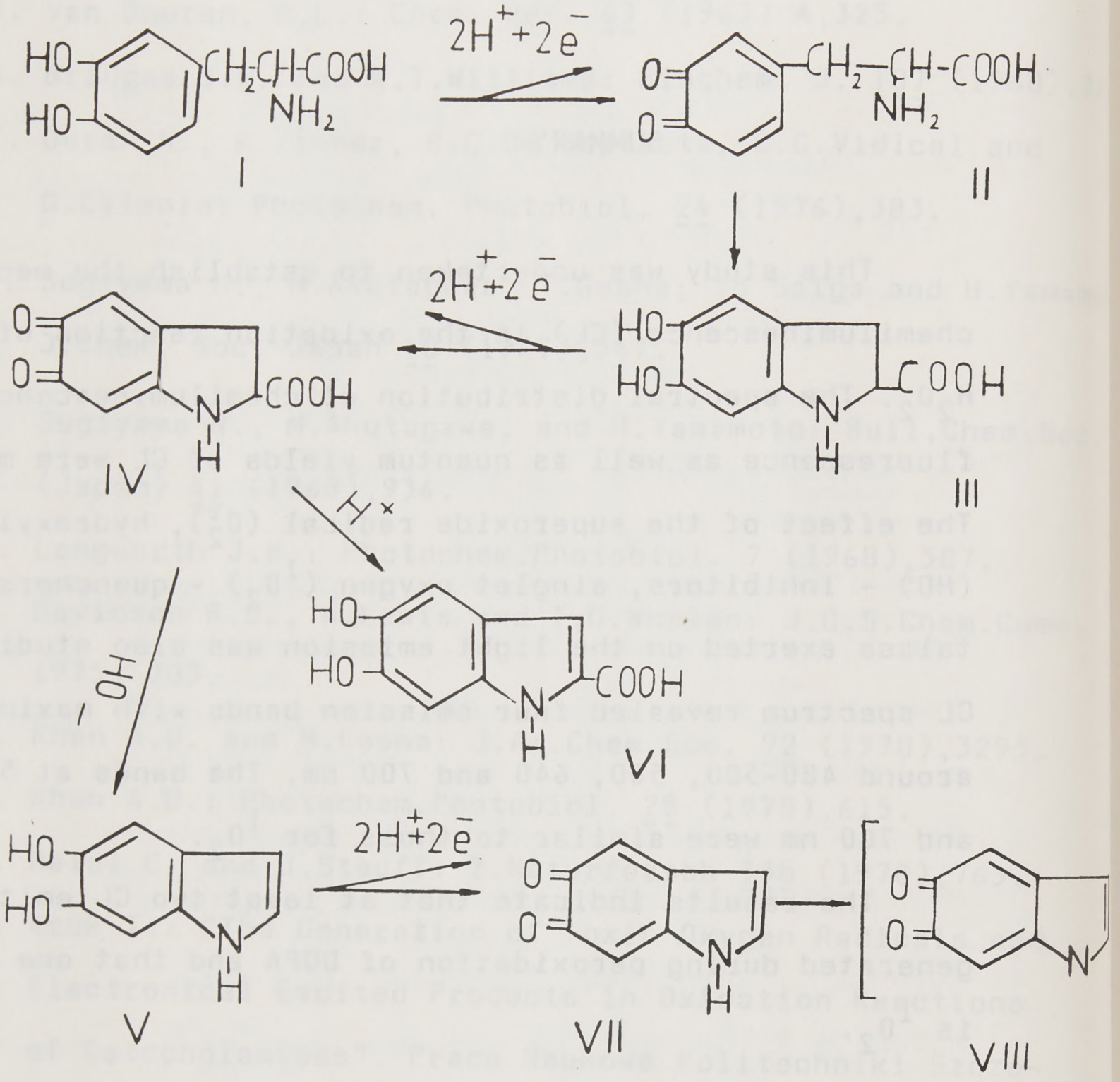


Fig.1. Steps of DOPA oxidation in the presence of molecular oxygen (after |6-9|).

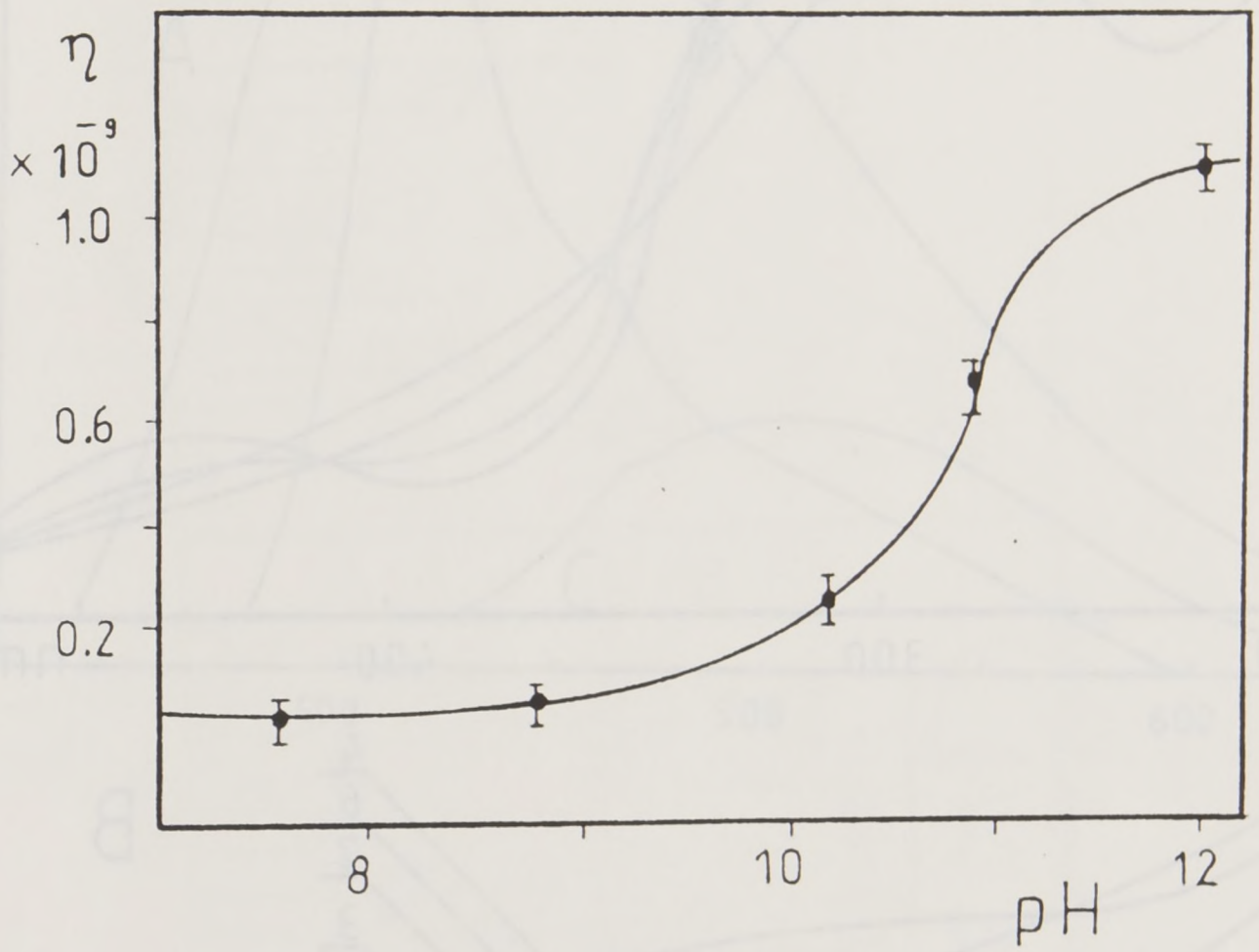


Fig.2. The effect of pH on the quantum yield of chemiluminescence (η). Reaction condition: 1 mM DOPA, 10 mM H_2O_2, 0.5 mM $CoCl_2$, 310 K. The CL intensity is expressed as the mean values ± S.D. of at least three experiments.

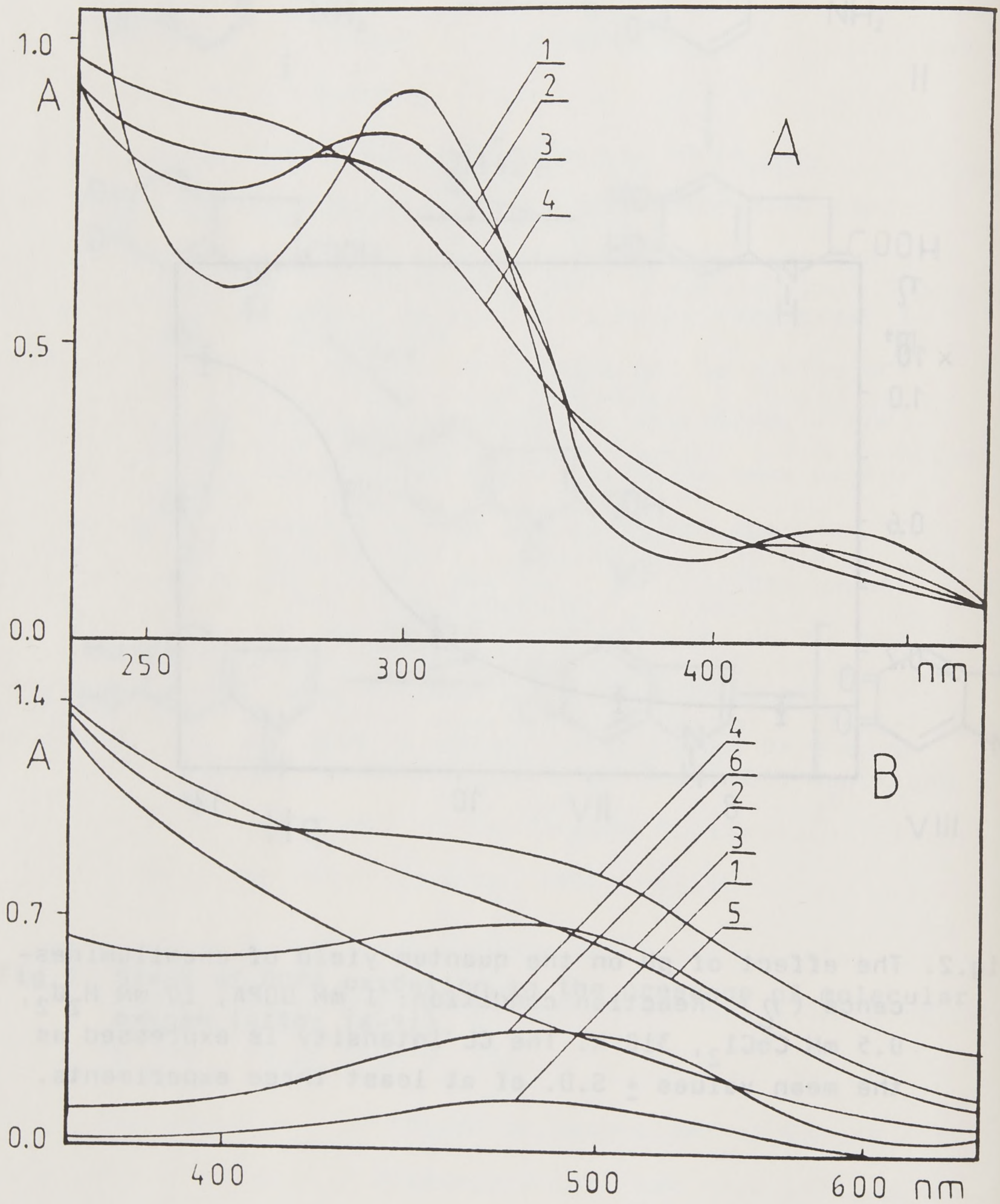


Fig.3. The change of UV and VIS spectra of DOPA in chemiluminescent reaction. Part A: 1-2 min, 2-7 min, 3-12 min, 4-40 min, pH 11.2. Part B: 1-2 min, 2-7 min, 3-20 min, 4-33 min, 5-42 min, 6-55 min, pH 7.4, 293 K. Reaction conditions: 1 mM DOPA, 0.5 mM $CoCl_2$, 10 mM H_2O_2.

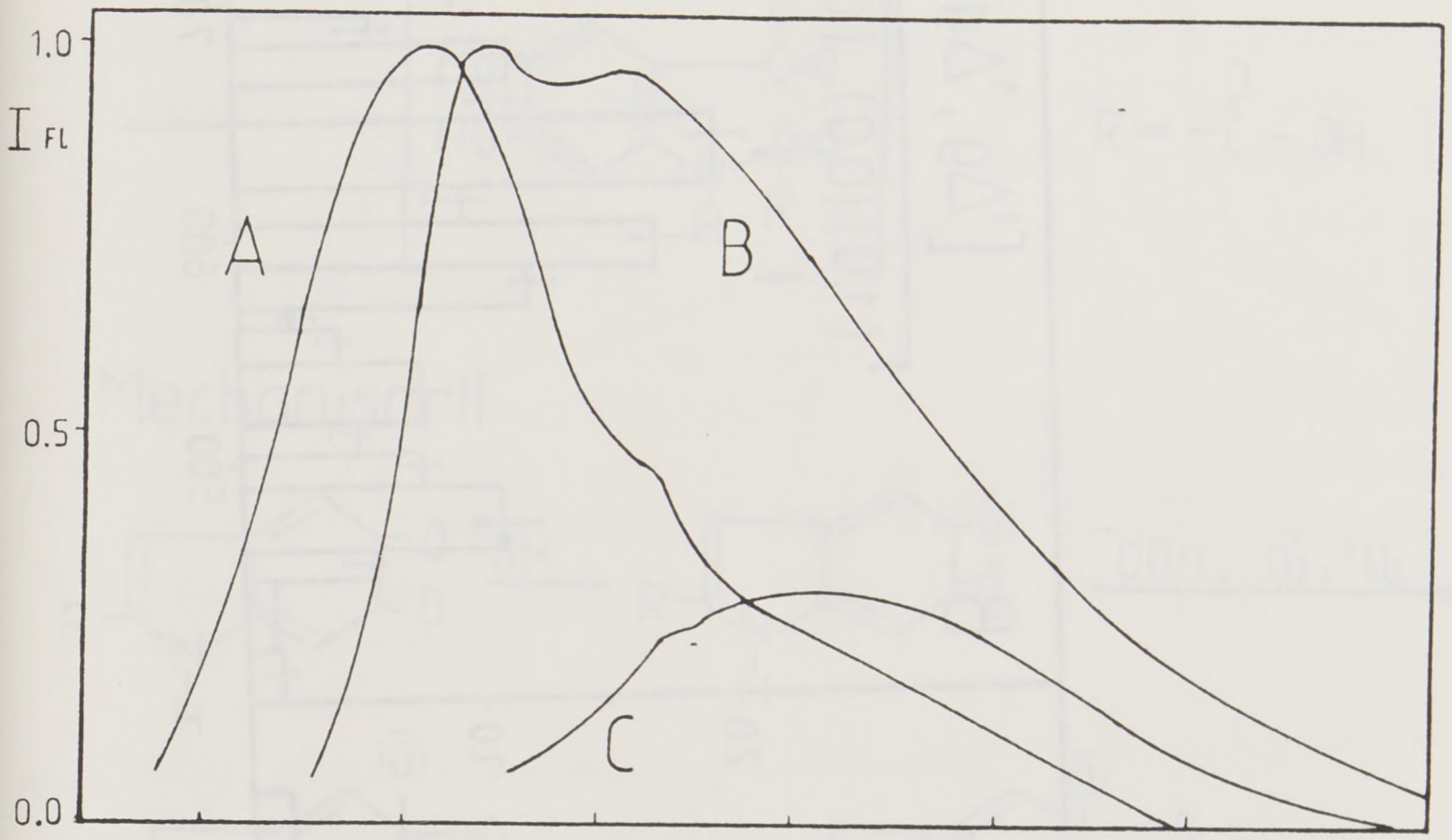


Fig.4. Fluorescence emission spectra of DOPA solution for the different λ_{exc} and time of peroxidation. Curves: A - λ_{exc} = 320 nm, t = 55 min. B - λ_{exc} = 366 nm, t = 20 min, C - λ_{exc} = 410 nm, t = 20 min, pH 11.2. Under the same condition as in Fig. 3.

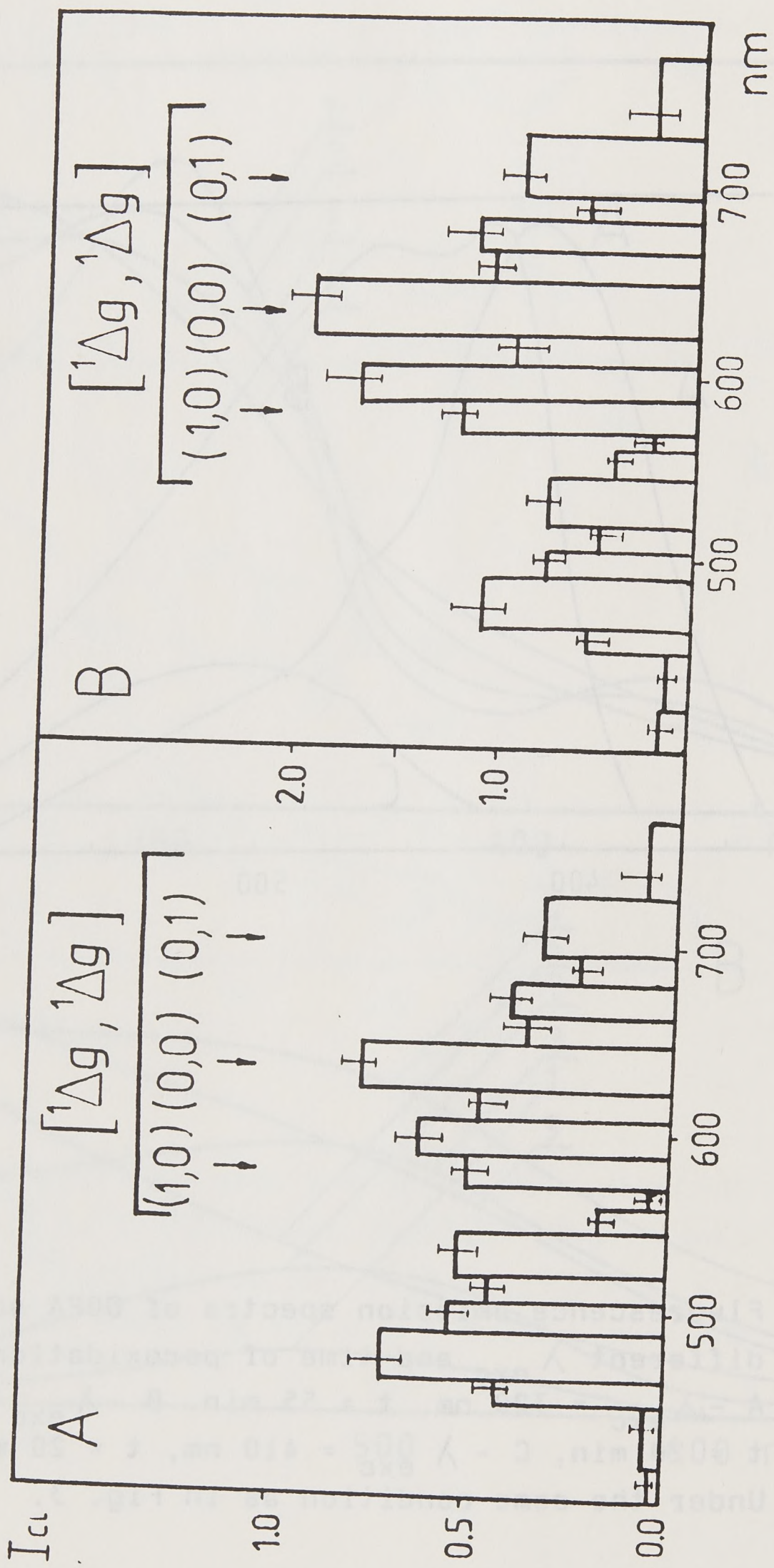
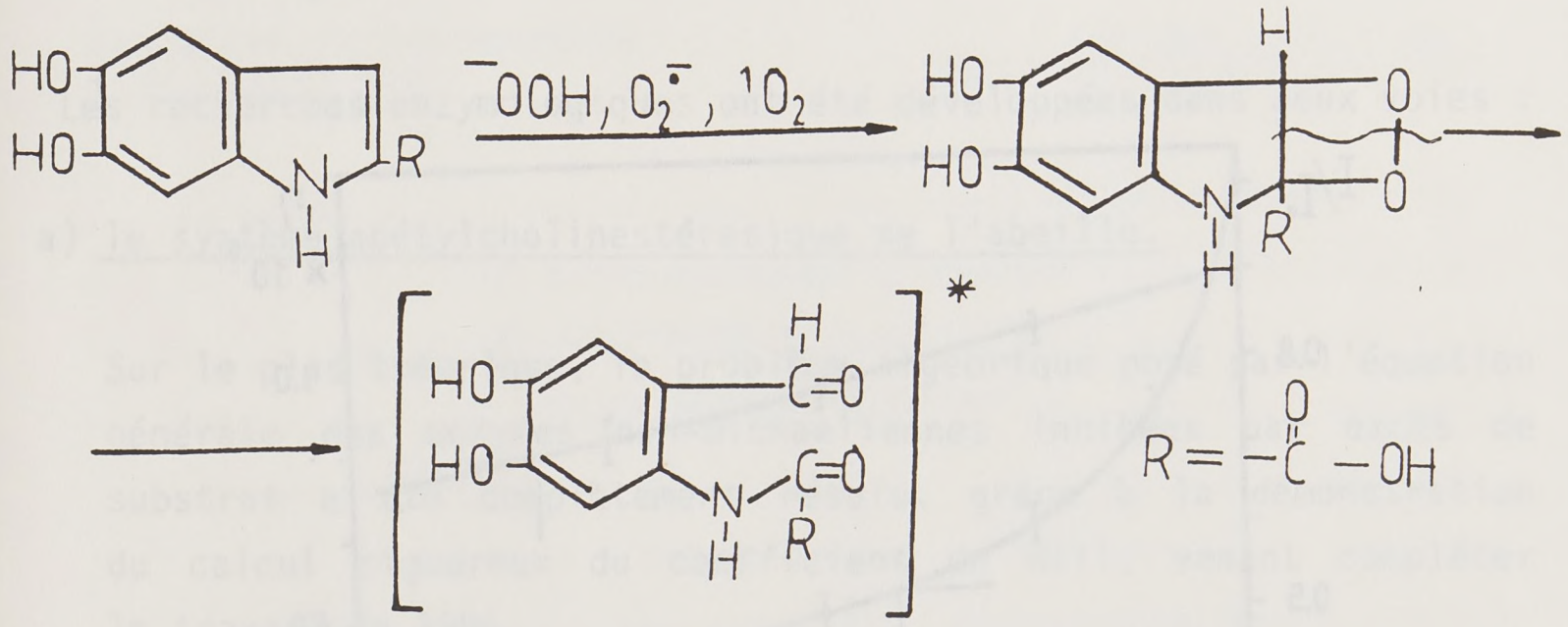


Fig.5. Chemiluminescence spectra of DOPA solution in H_2O (A) and D_2O (B) measured after 20 min, from the beginning of DOPA peroxidation. Reaction conditions: 1 mM DOPA, 0.5 mM $CoCl_2$, 10 mM H_2O_2, pH = 8.5, pD = 8.5.

Mechanism I



Mechanism II

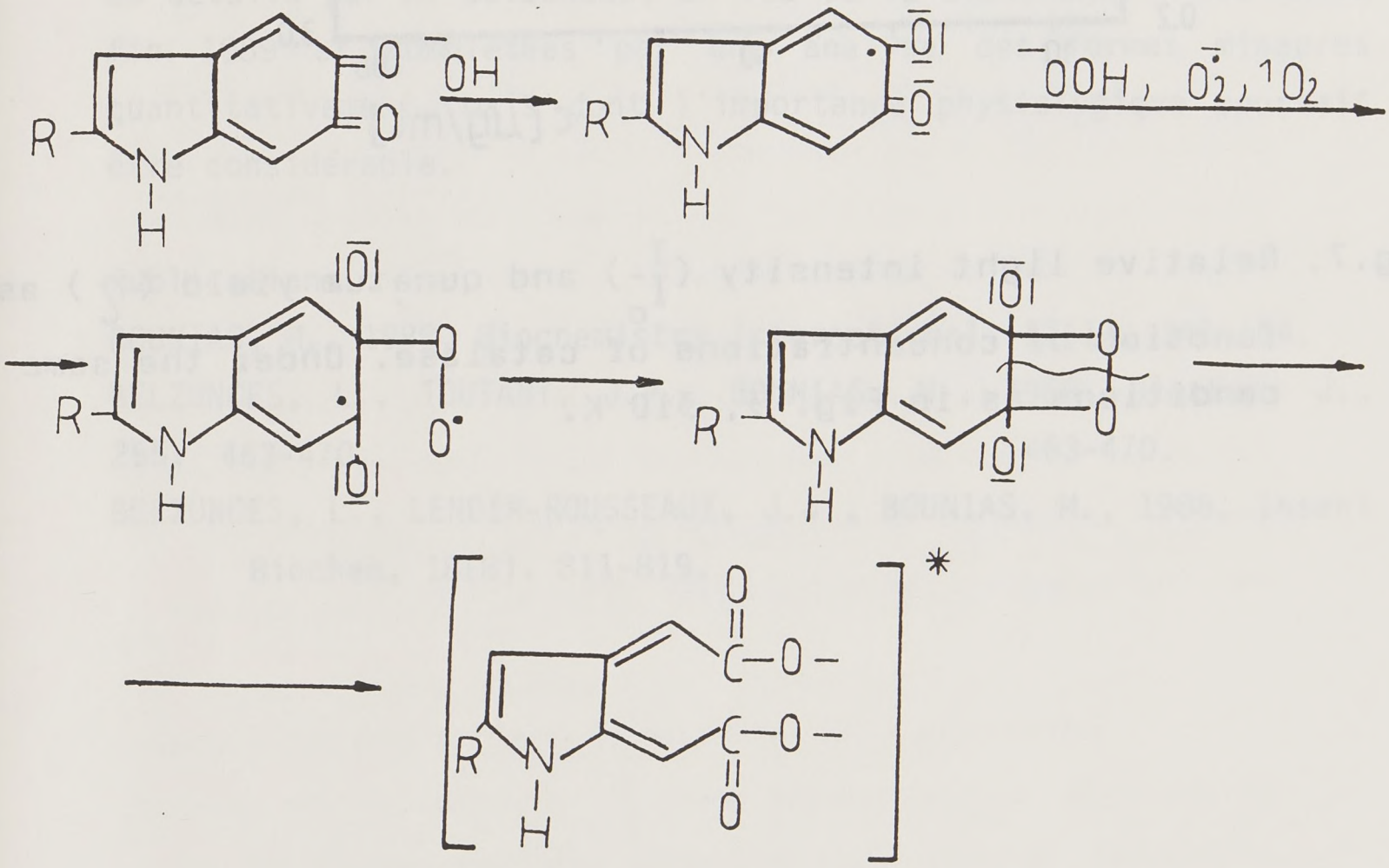


Fig.6. Reaction scheme for the chemiluminescence of DOPA.

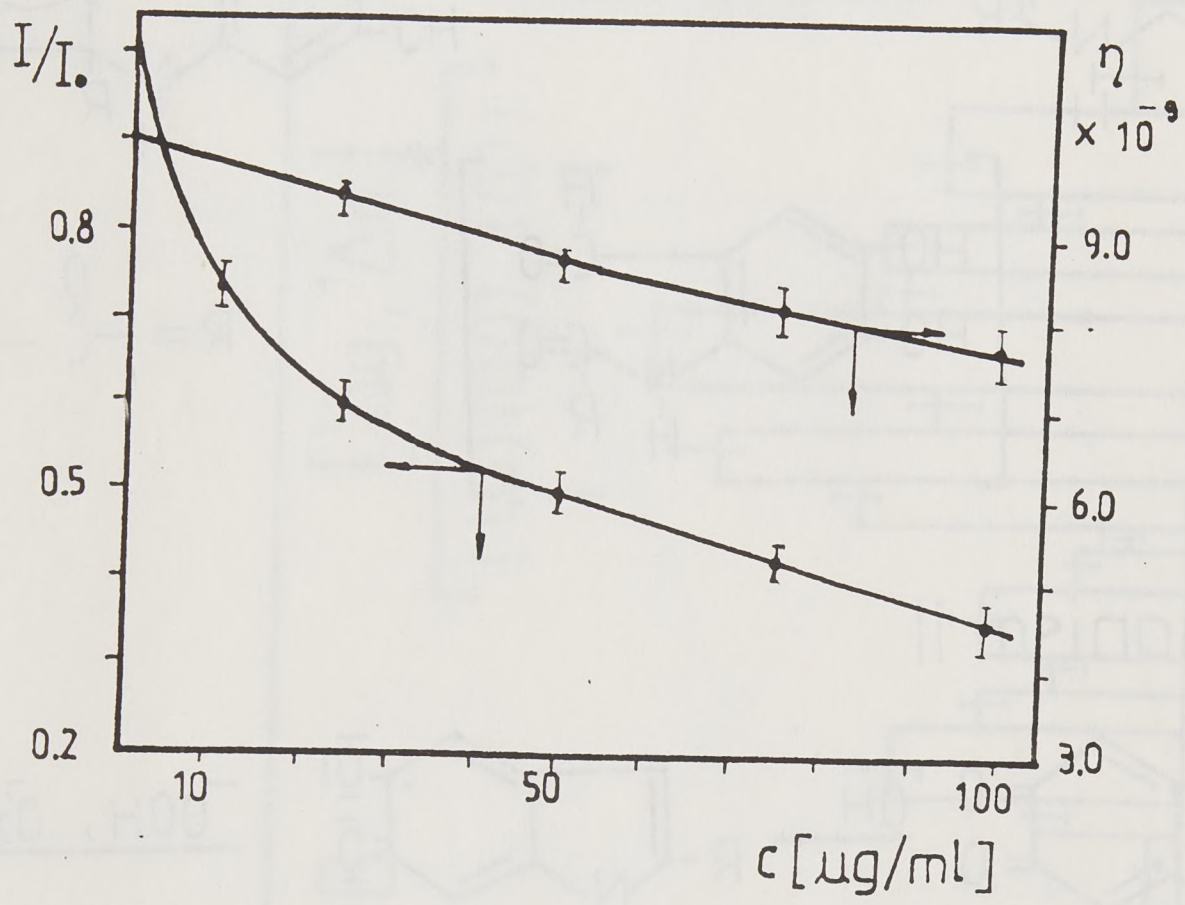


Fig.7. Relative light intensity ($\frac{I}{I_o}$-) and qunatum yield (η) as function of concentrations of catalase. Under the same conditions as in Fig. 3, 310 K.

Ces recherches se poursuivront en 1989 en vue d'élucider le mécanisme moléculaire de la synergie toxique entre l'ion cuivre et l'amitraz (voir : lutte contre la varroose de l'abeille).

C - Enzymologie

Les recherches enzymologiques ont été développées dans deux voies :

a) le système acétylcholinestérasique de l'abeille.

Sur le plan théorique, le problème algébrique posé par l'équation générale des enzymes non-michaeliennes inhibées par excès de substrat a été complètement résolu, grâce à la démonstration du calcul rigoureux du coefficient de Hill, venant compléter le travail de 1986.

Les propriétés physicochimiques de l'enzyme ont été étudiées en détails par M. Belzunces, en vue de la soutenance d'une thèse fin 1989 et complétées par une analyse des formes mineures quantitativement, mais dont l'importance physiologique pourrait être considérable.

Publications :

BOUNIAS, M., 1988. Biochemistry International, **17**(1), 147-154.

BELZUNCES, L., TOUTANT, J.P., BOUNIAS, M., 1988. Biochem. J., **255**, 463-470. 463-470.

BELZUNCES, L., LENOIR-ROUSSEAUX, J.J., BOUNIAS, M., 1988. Insect Biochem, **18**(8), 811-819.

Vol. 17, No. 1, July 1988 BIOCHEMISTRY INTERNATIONAL
Pages 147-154

RIGOROUS DETERMINATION OF THE HILL COEFFICIENT OF NON-MICHAELIAN SUBSTRATE-INHIBITED ENZYMES

Michel BOUNIAS

INRA and UNIVERSITY OF AVIGNON, Laboratory of Biochemistry

B.P. 91, F 84140 Montfavet (FRANCE)

Received April 12, 1988

Summary - The Hill coefficient (n), the max. velocity (VM) and the dissociation constants of the competent enzyme-substrate complex (Ks) and of the inhibitory bindings of substrate to both pure enzyme (Kse) and to ES (Kses) can be determined using a particular property of the representative equation. Choosing successive pairs of substrate concns (Si, Sj) in such a way as Si·Sj = 1, and plotting νj^{-1} versus νi^{-1} gives a family of straight lines whose slopes are : b = Ks.kses, i.e. $b = Sm^{2n}$, independent of Si, Sj. Then : n = Lnb/2 LnSm, where Sm corresponds to υm, maximum value of υ on the curve. All of the other parameters can be calculated from the value of n.

Introduction - The inhibition of an enzyme activity by excess of substrate is a widespread means of regulation of the cellular biochemical activity. Such mechanisms have been pointed out for a long time in the case of acetylcholinesterase kinetics (1)(2), but also, more recently, in various other enzymes such as sucrase (3), fructose biphosphatase (4) or triosephosphate isomerase (5).

Besides the usual difficulties of studying the kinetic parameters of these enzymes (6) it has also been shown that non

0158-5231/88/070147-08$01.00/0

Copyright © 1988 by Academic Press Australia.
All rights of reproduction in any form reserved.

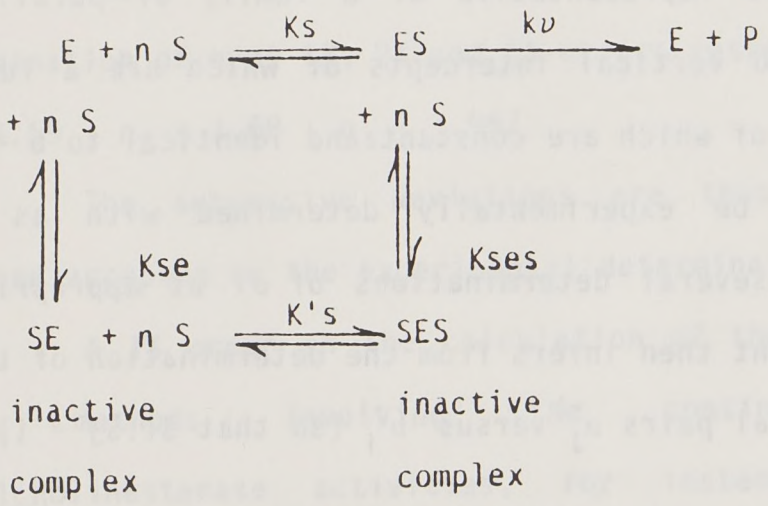
Vol. 17, No. 1, 1988 BIOCHEMISTRY INTERNATIONAL

Michaelian transitions may occur in the course of acetylcholinesterase activity (7). So far, no direct, way was available, in order to allow the determination of all the parameters that can be involved, particularly the dissociation constants of the inhibitory bindings of substrate to both free enzyme and enzyme-substrate competent complex, and the Hill coefficient of the substrate bindings.

In a recent study, it was shown that, provided a satisfactory estimation of V_M was obtained, then the Hill plot would allow the determination of all other parameters (8). However, the determination of V_M cannot be achieved with high accuracy when the substrate actually binds the free enzyme in an inactive way, so that all the other parameters may suffer from a more or less marked uncertainty in their subsequent determination.

The aim of the present work is to propose a rigorous algebraic method allowing the exact determination of the Hill coefficient of the enzyme, as a Key to the calculation of the other parameters.

Molecular model and methods - A. reaction scheme. The reaction can be written in the following simplified form :



where Ks, Kses, kse, Ks are the dissociation constants, and kυ the velocity constant.

The representative equation of the velocity, in steady state conditions is thus (8) :

$$\upsilon_i = V_M.S_i^n \,/\, |\ Ks + (1 + Ks/Kse)\ S_i^n + S_i^{2n} / Kses\ | \qquad |1|$$

The representative curve reaches a maximum υm at the substrate concentration $Sm = (Ks.Kses)^{1/2n}$ These values, experimentally accessible, can be verified using the remarkable property that for S_1 = 1 unit, the second abscissa point corresponding to υ_1 is Sm^2 (8).

B. Principle of calculation of n. Let us consider a couple of particular (choosen) values of the substrate, Si and Sj (giving the velocities υi and υj), so that si.sj = 1.

Then s_1^n can be expressed from equation |1| in the following two forms :

$$S_i^n = V_M.Kses.\ (\upsilon_i^{-1}) - Ks.Kses\ .S_i^{-n} - Kses\ (1 + Ks/Kse) \qquad |2|$$

$$S_i^n = V_M/Ks\ (\upsilon_j^{-1}) - S_i^{-n}/Ks.Kses - (1 + Ks/Kse)/ks \qquad |3|$$

by substracting |2| from |3| it comes :

$$(\upsilon_j^{-1}) = Ks.Kses\ (\upsilon_i^{-1}) + (1 + Ks/Kse)(1 - Ks.Kses)/V_M + S_i^{-n}\ Ks\ (1/Ks.Kses - Ks.\ Kses)/V_M \qquad |4|$$

Equation |4| is representative of a family of parallel straight lines, the horizontal and vertical intercepts of which are a function of S_i , and the common slopes of which are constant and identical to $b = Ks.Kses = S_m^{2n}$

Since Sm can be experimentally determined with as much accuracy as necessary, using several determinations of υi at appropriate values of Si , the Hill coefficient then infers from the determination of the regression slope (b) of several pairs υ_j^{-1} versus υ_i^{-1} (so that Si.Sj = 1) :

$$n = Ln\ b\ /\ 2.Ln\ Sm \qquad |5|$$

Vol. 17, No. 1, 1988 BIOCHEMISTRY INTERNATIONAL

It should be noted that equation |4| can be expressed in the alternative form :

$$(\upsilon_i^{-1}) = ks.kses\ (\upsilon_j^{-1}) + (\ 1 + Ks/Kse)(\ 1 - Ks.Kses)/VM + S_i^n\ Ks\ (\ 1/Ks.Kses - Ks.\ Kses)/VM \qquad |4\text{-}1|$$

This means that the slope of υ_j^{-1} versus υ_i^{-1} represents either Ks.Kses or $(Ks.Kses)^{-1}$ according the whether all Si values are <1 or >1.

Equation |4| is therefore valid provided υ_i are choosen from Si>1 and reciprocally for equation |4-1|.

Results and discusssion - Consider the case of an enzyme exhibiting the following parameters : VM = 10.0 units ; Ks = 0.1 unit ; Kses = 20.0 units ; Kse = 0.4 units ; n = 1.50 . Table 1 gives the expected values of the velocites from a series of substrate concentrations, and the range of errors, assuming that the velocities can be actually determined at ± 1% , ± 2% or ± 5%.

From batches of 5 different random distributions of the errors, a ± 1% deviation gave a calculated n = 1.48 (σn=0.07) that is a 1.3% shift from the theoretical value.

Then, in one particular case of random distribution, the determination of n at 1%, 2% and 5% errors respectively gave : n_1 = 1.59 ; n_2 = 1.68 ; n_5 = 1.957 .

The successive deviations are thus directly proportional to those accepted on the experimental determination of the velocities.

A 1% error on the calculation of the values of υi from the usual methods involving the continuous recording of acetylcholinesterase activities, for instance, using chromogenic substrates (9) is fairly easily attainable.

It can be thus expected, from the proposed method, an

Vol. 17, No. 1, 1988 BIOCHEMISTRY INTERNATIONAL

Table 1. Simulated values of the initial velocities of a substrate-inhibited enzyme exhibiting the following parameters : V_M = 10 units ; Ks = 0.1 unit ; Kses = 20.0 units ; Kse = 0.4 unit n = 1.50 . Deviations of 1 to 5% corresponding to possible experimental errors are given and used for the determination of errors on the calculation of n. Sm = 1.26 from the graphic plot.

Substrate concentrations (units)	expected velocities (units)	errors on velocities : 1% ±	2% ±	5% ±
0.10	2.26	0.02	0.04	0.11
0.20	4.21	0.04	0.08	0.21
0.50	6.45	0.06	0.13	0.32
1.0	7.14	0.07	0.14	0.36
2.0	7.00	0.07	0.14	0.35
5.0	5.50	0.05	0.11	0.27
10.0	3.50	0.03	0.07	0.17

accuracy on the calculation of the Hill coefficient of the same order of size as the accuracy on the determination of the initial velocities of the enzyme activity.

Then, this parameter being known, plotting Ln (v i/(VM- vi)) versus Ln Si gives a symmetrical plot, with two asymptotes whose slopes are respectively (+n) and (-n).

This plot, illustrated on fig. 1c, directly gives Ks and Kses, and allows Kse to be calculated from δ in equation |6| as follows. From an iterative cycle, successive values of VM , from a roughly estimated one as start point (8), should be introduced, until the actual values of the asymptotes exhibit the best consistency with the previously determined value of n. Then, the corresponding value

Vol. 17, No. 1, 1988 BIOCHEMISTRY INTERNATIONAL

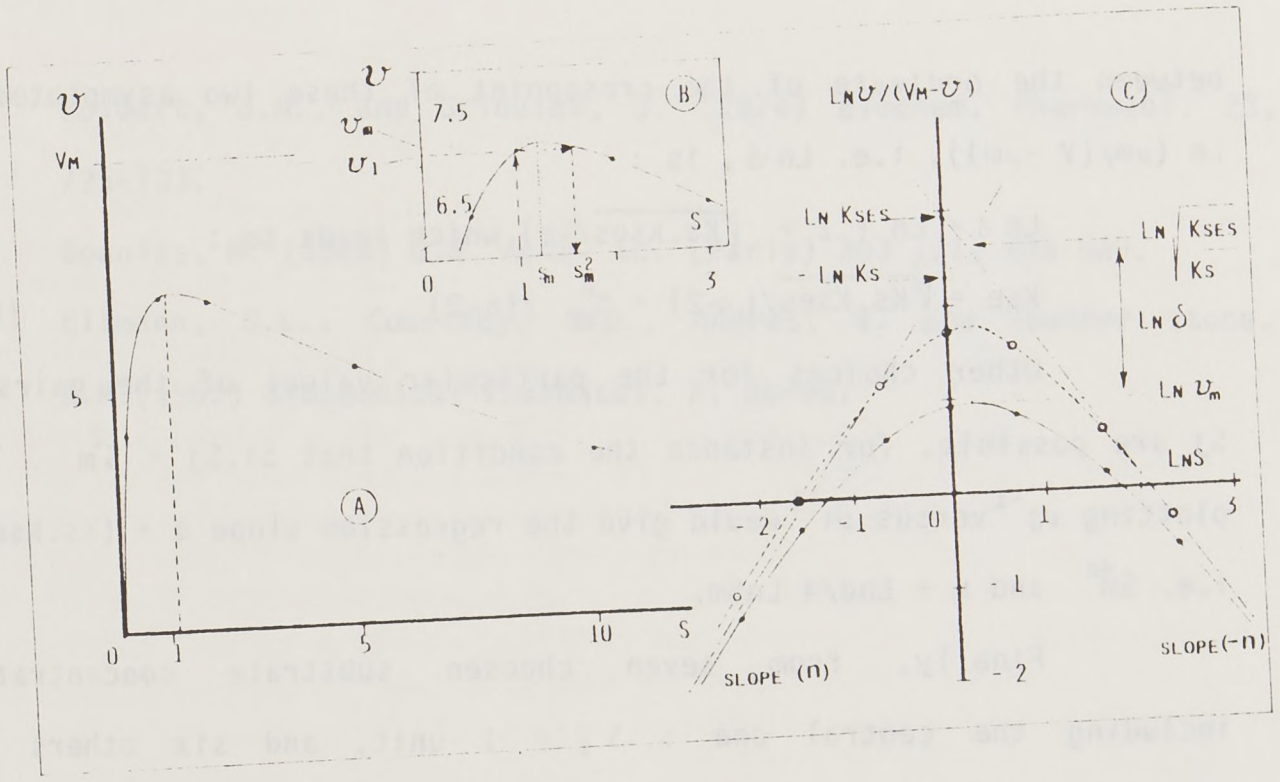


Figure 1 - A : Direct representation of velocities (v) v s substrate concns (S) with V_M = 10 units ; n = 1.5 ; Ks = 0.1 unit ; Kses = 20 units ; Kse = 0.4 unit. B : magnification of the zone S = 1 unit to S = S^2m. C : Hill plot showing the theoretical asymptotes (and their intercepts) and curve (——●——) and one approximate drawing (--- o ---) using an estimated V_M = 8.4 unit actually representing the ratio V_M /(1 + Ks/kse). This value is obtained from the horizontal intercept of a fictive straight line defined by two points whose coordinates are : ($x_1 = v_1$; $y = v_1 | Sm^n + Sm^{-n}|$) and ($x_2 = vm$; $y_2 = 2\,vm$) (Bounias, 1986). This value can be used as the start point of an iterative cycle for a more accurate determination (see text).

of V_M is the right one, and the plot allows (-Ln Ks) and (+Ln Kses) to be determined from the vertical intercept of the positively and negatively sloped asymptotes, respectively (8). Lastly, the difference

between the ordinate of the crosspoint of these two asymptotes and Ln ($\upsilon m/(V - \upsilon m)$), i.e. Ln δ, is :

$$\text{Ln}\,\delta = \text{Ln}\,(2 + \sqrt{Ks.Kses}/ke) \text{ which leads to :}$$

$$Kse = \sqrt{Ks.Kses}/(\delta-2) = S_m^n/(\delta-2) \qquad |6|$$

Other choices for the particular values of the pairs Si, Sj are possible, for instance the condition that $Si.Sj = S_m^2$. Then, plotting υj^{-1} versus υi^{-1} would give the regression slope $d = (Ks.Kses)^2$ i.e. Sm^{4n} and n = Lnd/4 LnSm.

Finally, from seven choosen substrate concentrations including the central one : S_1 = 1 unit, and six others well distributed in the range of experimentally accessible values of the initial velocities, the major five parameters of non-michaelian substrate-inhibited enzymes can be satisfactorily calculated, including the dissociation constant of the inactive binding of substrate to enzyme (Kse) which had, so far, never been considered in experimental studies, most likely because of the lack of appropriate algebraic methods.

REFERENCES -

1. Augustinsson K.B. (1948) Acta Physiol. Scand. Suppl. 15, 1-182.
2. Kunkee, R.E., and Zweig, G. (1963) J. Ins. Physiol. 9, 495-507.
3. Combes, D., and Monsan, P. (1981) Carbohydrate Research 93, 312-316.
4. Nimmo, H.G., and Tipton, K.F. (1975) Eur. J. Biochem. 58, 567-574.
5. Kurzok, H.G., and Feierabend, J. (1984) Biochim. Biophys. Acta 788, 214-221.
6. Marmasse, C. (1963) Biochim. Biophys. Acta 77, 530-536.

Vol. 17, No. 1, 1988 BIOCHEMISTRY INTERNATIONAL

7. Foidart, J.M., and Gridelet, J. (1974) Biochem. Pharmacol. 23, 725-733.

8. Bounias, M. (1986) C.R. Acad. Sc. (Paris) 303 III, 495-500.

9. Ellmann, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. and Feather stone, R.M.(1961) Biochemical Pharmacol. 7, 88-95.

Biochem. J. (1988) 255, 463–470 (Printed in Great Britain)

Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head

Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by Triton X-114 phase separation

Luc P. BELZUNCES,*‡ Jean-Pierre TOUTANT† and Michel BOUNIAS*
*I.N.R.A, Domaine Saint Paul, Laboratoire de Biochimie, B.P 91, 84140 Montfavet, France,
and †I.N.R.A, Station de Physiologie Animale, 9 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex, France

The polymorphism of bee acetylcholinesterase was studied by sucrose-gradient-sedimentation analysis and non-denaturing electrophoretic analysis of fresh extracts. Lubrol-containing extracts exhibited only one form, which sedimented at 5 S when analysed on high-salt Lubrol-containing gradients and 6 S when analysed on low-salt Lubrol-containing gradients. The 5 S/6 S form aggregated upon removal of the detergent when sedimented on detergent-free gradients and was recovered in the detergent phase after Triton X-114 phase separation. Thus the 5 S/6 S enzyme corresponds to an amphiphilic acetylcholinesterase form. In detergent-free extracts three forms, whose apparent sedimentation coefficients are 14 S, 11 S and 7 S, were observed when sedimentations were performed on detergent-free gradients. Sedimentation analyses on detergent-containing gradients showed only a 5 S peak in high-salt detergent-free extracts and a 6 S peak, with a shoulder at about 7 S, in low-salt detergent-free extracts. Electrophoretic analysis in the presence of detergent demonstrated that the 14 S and 11 S peaks corresponded to aggregates of the 5 S/6 S form, whereas the 7 S peak corresponded to a hydrophilic acetylcholinesterase form which was recovered in the aqueous phase following Triton X-114 phase separation. The 5 S/6 S amphiphilic form could be converted into a 7.1 S hydrophilic form by phosphatidylinositol-specific phospholipase C digestion.

INTRODUCTION

Acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) occurs in vertebrates in six distinct molecular forms which correspond to different quaternary associations of catalytic and non-catalytic subunits ([1,2] for reviews), including globular and collagen-tailed molecules [3,4].

In insects, although the presence of a tetrameric tailed enzyme has been described only in house fly [5], the biochemical polymorphism appears to be limited to globular molecules (see, e.g. [6,7]), with a major form common to the different species [8]. Some authors have described the existence of a single membrane AChE whose apparent sedimentation coefficient varies from 5.4 S to 5.7 S [9–11], whereas others have shown the presence of distinct biochemical variants [6,12–14]. Recent studies carried out in *Drosophila melanogaster* [15], *Tenebrio molitor* [16], *Pieris brassicae* [17,18] and on purified AChE from the housefly *Musca domestica* [19] have allowed the characterization of globular membrane forms with their hydrophilic counterparts.

In the present paper, we report advanced sedimentation and electrophoretic analysis of acetylcholinesterase from bee head, in which only a 7.3 S form solubilized by autolysis has been previously described [20]. The number of bee AChE forms and their properties were studied. The hydrophobic character of the bee enzyme was investigated by using the Triton X-114 phase-separation method [21] and the hydrodynamic behaviour upon removal of the detergent.

EXPERIMENTAL

Materials

Lubrol PX, Triton X-114, DTNB, iso-OMPA, bacitracin, benzamidine, leupeptin, aprotinin, pepstatin and acetylthiocholine iodide were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, U.S.A.). Triton X-100 was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). PI-PLC purified from *Bacillus thuringiensis* was given by Dr. G. Rougon, Aix-Marseille II University, Marseille, France.

Solubilization of AChE

All steps were carried out between 0 and 4 °C. Adult bees were anaesthetized with CO_2 and the head was severed from the body. The heads were immediately homogenized, with a glass Potter homogenizer, in the appropriate buffer to make a 10% (w/v) extract. The homogenate was filtered through cheesecloth and centrifuged for 30 min at 10000 *g* ($r_{av.}$ 5 cm). The post-mitochondrial 10000 *g* supernatant was kept and the pellet extracted and centrifuged twice as above. The 10000 *g* supernatants were pooled and centrifuged in a Beckman 50 Ti rotor ($r_{av.}$ 5.9 cm) for 1 h at 100000 $g_{av.}$. The 100000 *g* supernatant was kept and used for analysis. Different buffers were used for extraction procedures: high-salt detergent-containing buffer (high-salt Lubrol buffer), 1 M-NaCl/1% (w/v) Lubrol-PX/10 mM-Tris/HCl, pH 7.2; high-salt buffer, 1 M-NaCl/10 mM-Tris/HCl, pH 7.2; low-salt detergent-containing

Abbreviations used: AChE, acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7); iso-OMPA, tetraisopropyl pyrophosphoramide; DTNB, 5,5′dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); PI-PLC, phosphatidylinositol-specific phospholipase C.

‡ To whom correspondence should be addressed.

buffer (low-salt Lubrol buffer), 10 mM-NaCl/1 % Lubrol-PX/10 mM-Tris/HCl, pH 7.2; low-salt buffer, 10 mM-NaCl/10 mM-Tris/HCl, pH 7.2. All media were freshly made and sterile. Each buffer contained 1 mM-benzamidine, 5 μg of leupeptin/ml and 45 units of aprotinin/ml as anti-proteolytic agents.

Enzyme assay

Acetylcholinesterase was assayed at 20 °C by the method of Ellman *et al.* [22], in 1 ml of medium consisting of 1.5 mM-DTNB, 0.3 mM-acetylthiocholine iodide and 80 mM-Tris/HCl, pH 8.0. The reaction rate was monitored spectrophotometrically by the increase in A_{412}. β-Galactosidase was assayed in 1 ml of medium consisting of 0.1 M-phosphate buffer, pH 7.0, containing 20 mM-*o*-nitrophenyl β-D-galactopyranoside, 10 mM-NaCl, 1 mM-$MgCl_2$ and 0.1 M-β-mercaptoethanol. The change in A_{410} was monitored. Alkaline phosphatase was assayed in 1 ml of medium consisting of 1 mM-sodium *p*-nitrophenyl phosphate and 0.1 M-Tris/HCl, pH 8.5. The change in A_{410} was monitored. Catalase was assayed by the spectrophotometric method of Beers & Sizer [23].

Sucrose-gradient-sedimentation analysis

Centrifugations were usually performed in 5 20 % (w/v) linear sucrose gradients prepared in the homogenization buffers. Detergent or 1 M-NaCl was omitted or added as appropriate in order to study hydrophobic interactions and the sedimentation properties of the enzyme. Samples (200 300 μl) of enzyme solution were layered on analytical gradients and of up to 500 μl on preparative gradients. Centrifugations were performed at 4 °C on a Beckman SW 41 rotor for 14–16 h at 39000 rev./min ($r_{av.}$ 10.95 cm; 185000 $g_{av.}$). *Escherichia coli* β-galactosidase (EC 3.2.1.23) (16 S), ox liver catalase (EC 1.11.1.6) (11.3 S) and *E. coli* alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) (6.1 S) were used as internal sedimentation standards.

Non-denaturing gel electrophoresis

Electrophoreses were performed at 20 V/cm for 3.5 h, in the presence of 0.5 % detergent, in a discontinuous anodic system with *NN'*-methylenebisacrylamide as cross-linker. The stacking gel consisted of 3.75 % total acrylamide (T) and 2.6 % cross-linker (C), 0.5 % detergent and 62 mM-Tris/HCl, pH 6.8. The resolving gel consisted of 7 % acrylamide (7 % T, 2.6 % C), 0.5 % detergent and 0.375 M-Tris/HCl, pH 8.9. The running buffer was composed of 0.5 % detergent and 10 mM-Tris/glycine, pH 8.3. The detergents used were Lubrol PX and Triton X-100. High-ionic-strength samples were dialysed against low-salt buffers and, before electrophoresis, all samples were equilibrated at pH 6.8. The final detergent concentration of the sample buffer was 0.5 %. Electrophoreses were also performed at 10 V/cm for 2.75 h in a horizontal continuous system containing identical concentrations of polyacrylamide and cross-linker (7 %T, 2.6 %C), in the presence of 0.5 % detergent. Gel and running buffer contained 50 mM-Tris/glycine, pH 8.9. The samples were equilibrated with the running buffer before electrophoresis.

Characterization of AChE activity after electrophoresis

A modification of the method of Karnovsky & Roots [24] was used. The incubation solution consisted of 1 vol. of a solution of 5 mM-potassium ferricyanide mixed immediately before use with 9 vol. of a freshly prepared 0.1 M-maleate buffer, pH 6.0, containing 5.5 mM-trisodium citrate, 3.3 mM-$CuSO_4$, 2 mM-acetylthiocholine iodide and 10 μM-iso-OMPA as inhibitor of pseudocholinesterases. After electrophoresis, the gel was washed with distilled water and stained at room temperature with the incubation solution until AChE activities became visible. Quantitative densitometric scanning of gels were performed at 475 nm with a Shimadzu CS-930 spectrodensitometer. The proportions of molecular forms were estimated by integration of the areas of individual peaks.

Triton X-114 phase separation

The detergent Triton X-114 was used to study the hydrophobic character of AChE forms. Triton X-114 solutions were prepared as described by Bordier [21]. Detergent-free samples were mixed with $\frac{1}{3}$ vol. of the washed Triton X-114 solution at 4 °C and kept for 10 min at 0 °C with occasional stirring. The solution was then warmed to 30 °C for 10 min to allow phase separation. Triton X-114 was recovered by centrifugation at room temperature at 10000 *g* for 3 min. The lower Triton X-114 phase was kept, and the upper aqueous phase was subjected twice more to phase separation. AChE distribution in the lower detergent phase and in the upper aqueous phase was studied. Partial removal of the amphiphilic form from the extract may be performed by quick contact, at 4 °C, with a small amount of Triton X-114 solution.

Solubilization of AChE by PI-PLC

Bee heads were homogenized in low-salt buffer (10 mM-NaCl/10 mM-Tris/HCl, pH 7.2, containing 0.1 mg of bacitracin/ml) at 0 °C with a Sorvall Omni-Mixer to make a 10 % (w/v) extract. The extract was filtered through cheesecloth and centrifuged at 4 °C for 10 min at 3000 $g_{av.}$ ($r_{av.}$ 5 cm). The post-nuclear 3000 *g* supernatant was centrifuged at 4 °C in a Beckman 70.1 Ti rotor ($r_{av.}$ 6.1 cm) for 20 min at 30000 $g_{av.}$. The crude membrane pellet was washed and resuspended in $\frac{1}{8}$ extract vol. of low-salt buffer containing 0.1 mg of bacitracin/ml, 103 units of aprotinin/ml, 20 μg of pepstatin/ml and 5 μg of leupeptin/ml as anti-proteolytic agents. Electrophoretic analysis revealed that the membrane pellet contained exclusively the 5 S/6 S membrane-bound AChE. Phospholipase digestion was performed at 22 °C on the resuspended membrane pellet by adding PI-PLC to a final concentration of 5 units/ml. At different times, samples were removed and centrifuged with a Beckman Airfuge for 5 min at 30 lb/in^2 (210 kPa) (165000 *g*). The supernatant was kept and used for analysis. A part of the resuspended pellet was used as blank without PI-PLC. One PI-PLC unit corresponded to 1 μmol of phosphatidylinositol hydrolysed/min.

RESULTS

Polymorphism of bee AChE

In these experiments a high degree of solubilization (98 %) of AChE, achieved by high-salt Lubrol-PX-containing buffers, was of particular importance in order to characterize all native forms. Low-salt Lubrol buffer, high-salt buffer and low-salt buffer gave respectively 82 %, 22 % and 14 % solubilization efficiencies. The polymorphism of bee AChE was studied by gradient

Two forms of acetylcholinesterase from bee head

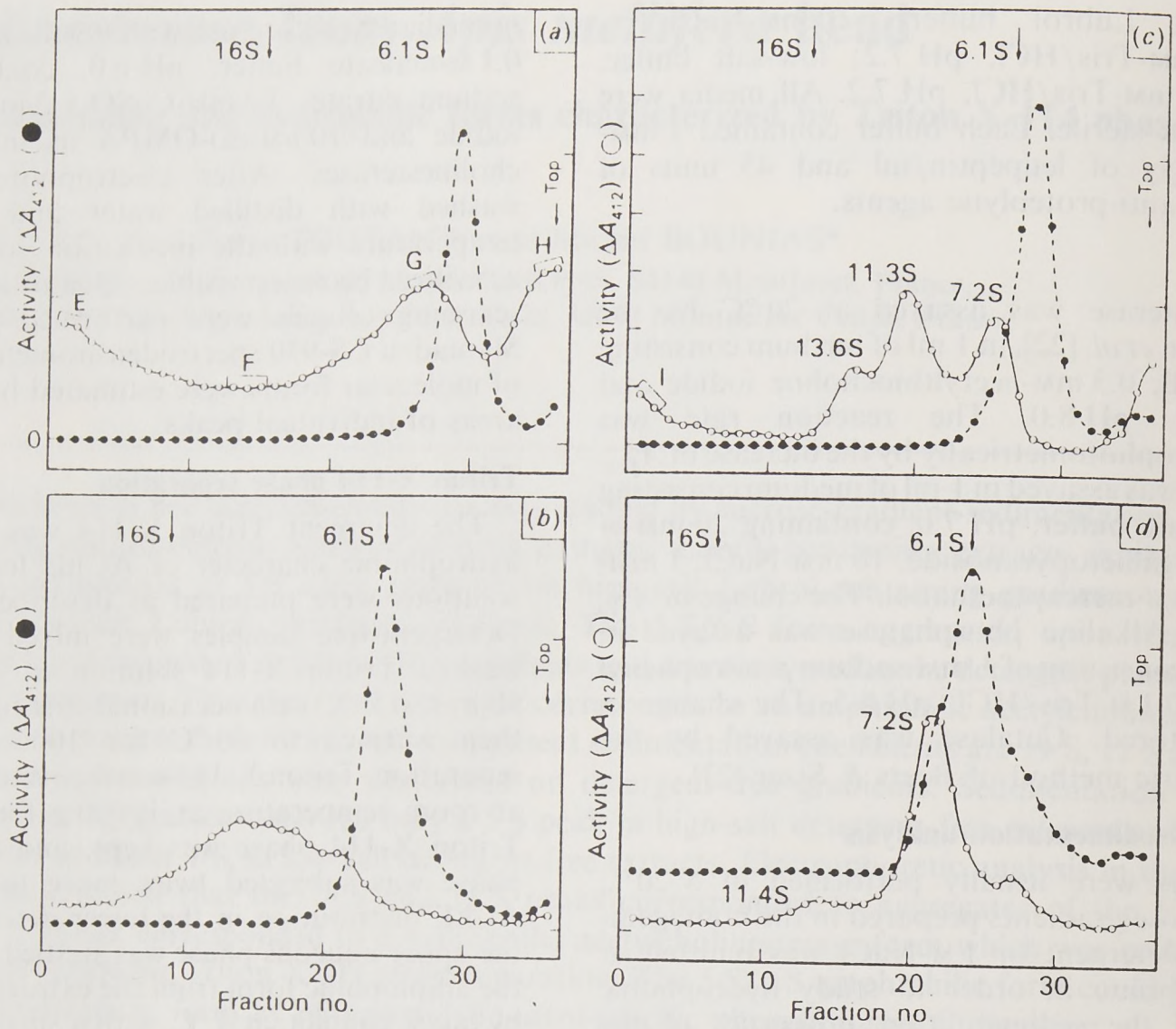


Fig. 1. Sedimentation analysis of AChE solubilized by different extraction procedures

AChE from bee heads was solubilized by using different buffers as described in the Experimental section. Extracts were sedimented in 5–20% (w/v) sucrose gradients made in the homogenization buffers in the presence (●) or in the absence (○) of 1% Lubrol PX. (*a*) High-salt Lubrol extract; (*b*) low-salt Lubrol extract; (*c*) high-salt detergent-free extract; (*d*) low-salt detergent-free extract. Activities are shown as changes in A_{412} and are plotted on relative scales. In (*a*) and (*b*) each graduation represents an absorbance variation of 0.5 per unit of time; in (*c*) and (*d*) each graduation represents an absorbance variation of 0.04 per unit of time. Fractions marked by square brackets were pooled and used for non-denaturing electrophoretic analysis in the presence of detergent.

sedimentation analysis and non-denaturing polyacrylamide-gel electrophoresis. Extraction procedures were carried out with a single buffer system instead of one with several buffers [17,25].

Sedimentation analysis of detergent-containing extracts gives relatively simple patterns. The sedimentation of high-salt Lubrol extracts on detergent-containing gradients revealed a single peak of activity whose apparent sedimentation constant was 5 S (Fig. 1*a*). For low-salt Lubrol extracts a single peak was still observed, but the apparent sedimentation coefficient was 6.1 S (Fig. 1*b*). No shoulder was observed in either case. High- and low-salt Lubrol extracts sedimented in detergent-free conditions resulted in the formation of polydisperse aggregates (Figs. 1*a* and 1*b*).

Sedimentation analysis of detergent-free extracts exhibited more complicated patterns than those observed with detergent extracts. Three well-resolved peaks of activity, sedimenting at 13.6 S, 11.3 S and 7.2 S, were observed when high-salt extracts are sedimented on detergent-free gradients, but the 14 S peak (13.6 S peak) was not always found in low-salt extracts (Figs. 1*c* and 1*d*). The presence of larger aggregates (over 14 S) varies from one homogenate to another, but the 14 S and the 11 S peaks were observed in all high-salt extracts analysed if great care was taken to avoid lipid resuspension, after the 100000 *g* centrifugation, which resulted in the formation of polydisperse AChE activity along the gradient (Figs. 1*c* and 1*d*). Sedimentation analysis of high-salt extracts performed in the presence of detergent exhibited only one major peak, corresponding to the 5 S form previously characterized (Fig. 1*c*), whereas with low-salt extract a peak sedimenting at 6.1 S with a shoulder at about 7 S was found (Fig. 1*d*).

The major form sedimented at 5 S in high-salt detergent conditions and 6 S in low-salt detergent conditions. The variation of the apparent sedimentation coefficient could be due to the density of the sedimentation medium, or the 5 S form could correspond to the 6 S form from which a subunit was dissociated at high ionic strength. To check the validity of these alternative hypothesis, the reversibility of the sedimentation shift was first tested. The 6 S form recovered from low-salt detergent gradient was re-centrifuged on a high-salt Lubrol gradient and, as expected, the characteristic 5 S form was observed (Fig. 2). In order to test the 5 S to 6 S shift, the 5 S form recovered from high-salt Lubrol gradient was dialysed for 36 h against low-salt Lubrol buffer and sedimented on a low-salt Lubrol gradient. Then the 6 S form was observed (Fig. 2). Furthermore, electrophoretic analysis of the 5 S and 6 S forms (isolated from gradients in high- and low-salt conditions respectively) then revealed no

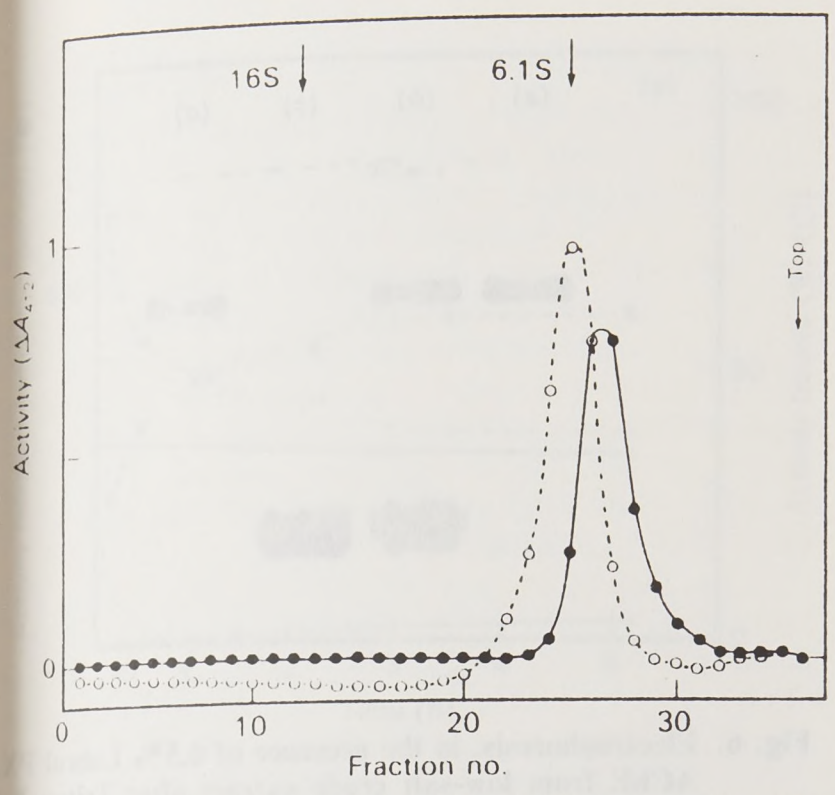


Fig. 2. Identity between the 5 S and the 6 S forms recovered from high-salt and low-salt Lubrol-containing gradients

The 6 S form recovered from a low-salt Lubrol gradient was re-sedimented on a high-salt Lubrol gradient (●). The 5 S form recovered from a high-salt Lubrol gradient was dialysed for 36 h at 4 °C against the low-salt Lubrol buffer and then re-sedimented on a low-salt Lubrol gradient (○).

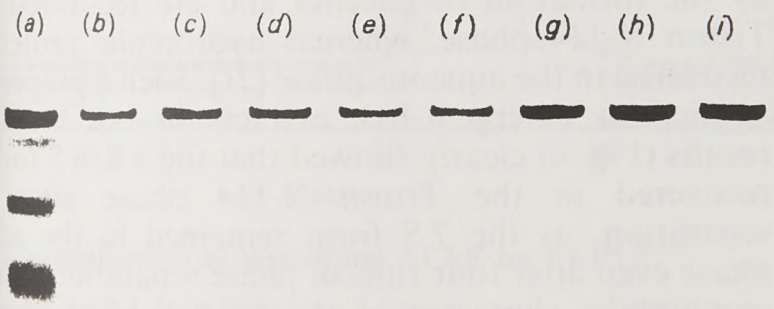


Fig. 3. Non-denaturing electrophoresis, in the presence of 0.5% Triton X-100, of AChE activities recovered from sucrose gradients

Lane (*a*) *Drosophila melanogaster* AChE molecular forms. From the top to the bottom: dimeric amphiphilic form, monomeric amphiphilic form, dimeric hydrophilic form, monomeric hydrophilic form (according to Toutant *et al.* [15]). Lane (*b*), 5 S form. Lane (*c*), 6 S form. Lane (*d*), 5 S/6 S form from the microsomal pellet. Lanes (*e*)–(*i*), fractions corresponding to aggregates from the gradients of Fig. 1, fractions E–I respectively.

difference in their migration (Fig. 3). Thus the sedimentation shift was not due to the dissociation of a lighter putative subunit.

The nature of the aggregates obtained from high- and low-salt Lubrol extracts sedimented in detergent-free conditions was investigated by electrophoretic analysis, which is more sensitive than re-centrifugation analysis. Fractions collected from the top to the bottom of the gradients were subjected to electrophoresis in the

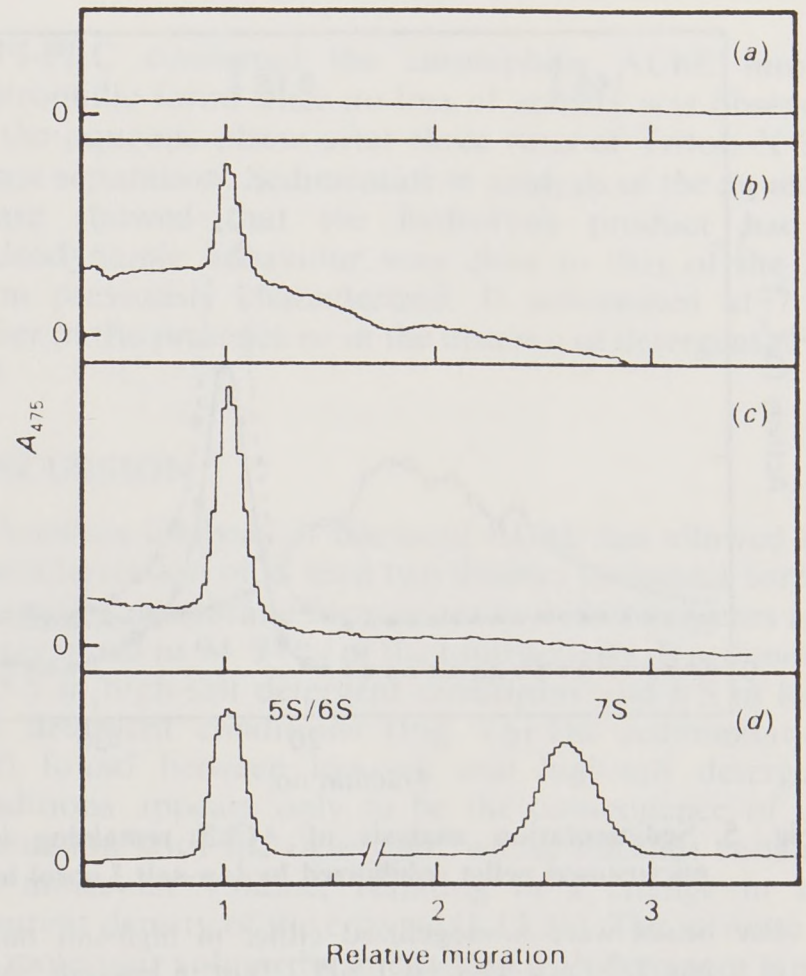


Fig. 4. Non-denaturing electrophoresis, in the presence of 0.5% detergent, of the AChE activity from the 14 S, 11 S and 7 S peaks recovered from high-salt detergent-free gradients

Because the activity of AChE was low, the sensitive detection of electromorphs was carried out by spectrodensitometric scanning of electrophoretic gels at 475 nm. In (*a*)–(*c*) electrophoresis was performed in the presence of 0.5% Triton X-100, whereas in (*d*) it was performed in the presence of 0.5% Lubrol PX. (*a*) AChE activity from the 7 S peak. (*b*) AChE activity from the 11 S peak. (*c*) AChE activity from the 14 S peak. (*d*) Activity from the 7 S peak in the presence of 0.5% Lubrol PX, and 5 S/6 S marker. Relative migration corresponds to the ratio migration distance of the band of activity/migration distance of the 5 S/6 S band.

presence of detergent (0.5%). The results obtained (Fig. 3) showed the presence of the 5 S/6 S form in all aggregates analysed. The presence of this form at the top of the detergent-free gradient is noteworthy, likely complexed with lipids. Thus it appears that the solubilization of the 5 S/6 S form was very dependent on the presence of amphiphilic compounds, which allow the dissociation of aggregates.

The 14 S, 11 S and 7 S forms were also subjected to electrophoresis in the presence of detergent. The presence of the 5 S form in the 14 S and 11 S peaks was unambiguously demonstrated, but, for the 7 S peak, only a very weak 5 S activity was observed when electrophoreses was performed in the presence of Triton X-100. However, electrophoresis of the 7 S activity recovered from preparative gradients, in the presence of Lubrol PX, showed an additional fast-migrating form (Fig. 4). Thus this 7 S form appears to be inhibited by the detergent Triton X-100.

The AChE activity remaining in the microsomal pellet was investigated. After solubilization, the activity in the microsomal pellet accounted for about 34% and 20% of the total non-solubilized activity when high-salt buffer

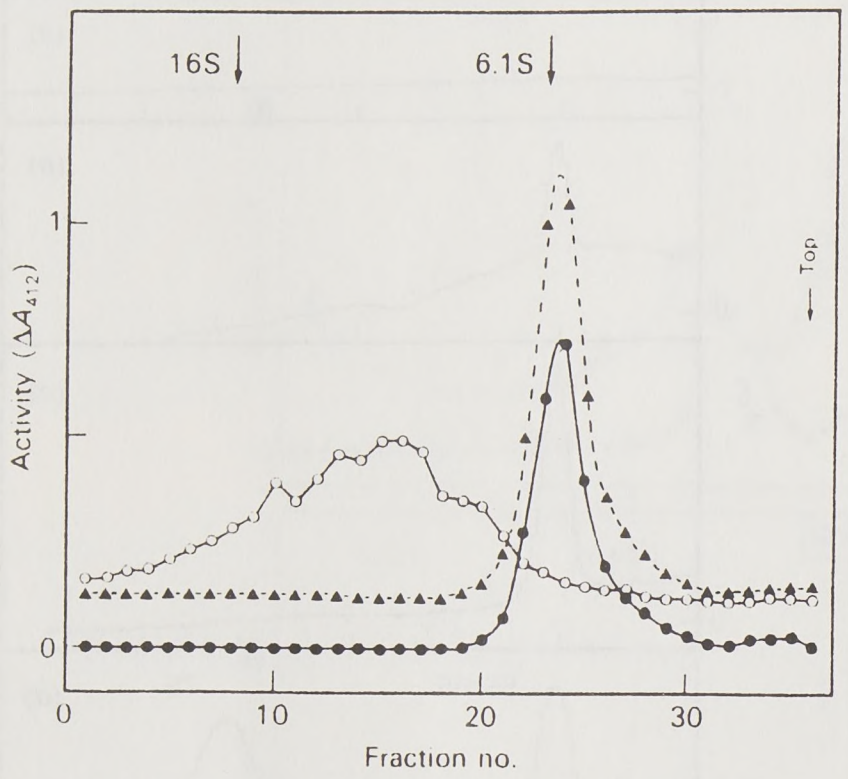


Fig. 5. Sedimentation analysis of AChE remaining in the microsomal pellet solubilized by low-salt Lubrol buffer

Bee heads were homogenized either in high-salt buffer (1 M-NaCl/10 mM-Tris/HCl, pH 7.2) or in low-salt buffer (10 mM-NaCl/10 mM-Tris/HCl, pH 7.2), and the homogenates were centrifuged at 4 °C for 30 min at 10000 g_{av}. The post-mitochondrial supernatants were centrifugated at 4 °C for 1 h at 100000 g_{av}. The crude microsomal pellets were washed and solubilized by the low-salt Lubrol buffer (1 % Lubrol PX/10 mM-NaCl/10 mM-Tris/HCl, pH 7.2), and then centrifuged at 4 °C for 1 h at 100000 g_{av} to obtain soluble fractions. The soluble fractions were sedimented in low-salt gradients (5–20 % sucrose in 1 % Lubrol PX/10 mM-NaCl/10 mM-Tris/HCl, pH 7.2). ▲, Soluble fraction from high-salt microsomal pellet; ●, soluble fraction from low-salt microsomal pellet; ○, centrifugation in the absence of detergent.

and low-salt buffer, respectively, were used. The acetylcholinesterase activity in the microsomal pellets, recovered after the high- and low-salt extractions, was completely solubilized in low-salt Lubrol buffer. Sedimentation and electrophoretic analysis revealed in both cases a form identical with the 5 S/6 S one, which aggregates upon removal of detergent (Figs. 3 and 5). The same results were obtained for the mitochondrial pellets.

All of the extracts studied (low- and high-salt detergent-free or detergent-containing), subjected to electrophoretic analysis, exhibited the fast-migrating minor form corresponding to the 7 S peak. The amount of the 7 S form was assessed by two different methods: the comparison of the 7 S and 5 S/6 S activities obtained from gradient centrifugation and the spectrodensitometric analysis of electrophoretic gels. Accordingly, it was found that the 7 S form represented 3–6 % of the total AChE activity present in high-salt Lubrol extracts.

Hydrophobicity of bee AChE

The hydrophobic character of the two AChE forms was studied by electrophoresis in the presence of detergent, by the Triton X-114 phase-separation method. Phase separation of Triton X-114 solutions occurs at

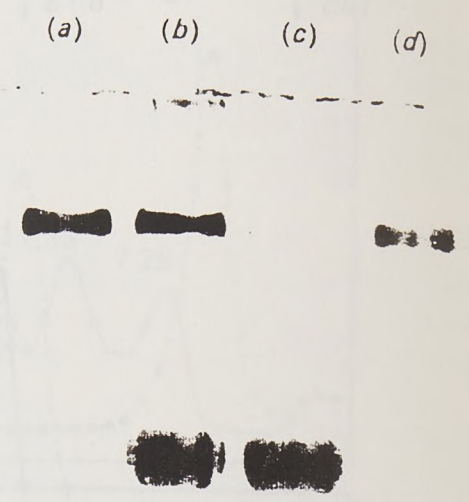


Fig. 6. Electrophoresis, in the presence of 0.5 % Lubrol PX, of AChE from low-salt crude extract after Triton X-114 phase separation

Lanes: (*a*) 5 S/6 S form isolated from gradient; (*b*), AChE from crude low-salt extract; (*c*), AChE recovered in aqueous phase after Triton X-114 phase separation; (*d*), AChE recovered in detergent phase after Triton X-114 phase separation.

about 20 °C, resulting in the appearance of two phases respectively depleted and enriched in detergent. Amphiphilic integral membrane proteins interact with detergent by the formation of micelles and are recovered in the Triton X-114 phase, whereas hydrophilic proteins are recovered in the aqueous phase [21]. Such a property was applied to detergent-free extracts of bee heads. The results (Fig. 6) clearly showed that the 5 S/6 S form was recovered in the Triton X-114 phase after phase separation, as the 7 S form remained in the aqueous phase even after four runs of phase separation. Thus the amphiphilic character of the 5 S/6 S AChE was confirmed, whereas the 7 S AChE appeared to be essentially hydrophilic.

Solubilization of AChE by PI-PLC

The ability of PI-PLC to solubilize bee AChE was studied on the 5 S/6 S form from a crude 30000 membrane fraction. Electrophoretic analysis revealed that this fraction contained only the 5 S/6 S membrane-bound AChE and was devoid of the hydrophilic form. Results shown in Fig. 7(*a*) showed that PI-PLC from *thuringiensis* at a concentration of 5 units/ml was able to release bee AChE directly from membranes. The initial solubilization rate was 0.58 % of the membrane-bound activity solubilized/min per unit of PI-PLC. After incubation for 4 h, no significant release of AChE from membranes occurred, and the amount of solubilized AChE became stable at about 60 % of the initial membrane-bound activity. After digestion for 5.5 h, the membrane fraction was pelleted and washed twice, and finally resuspended in a fresh digestion medium containing 15 units of PI-PLC/ml. A 3-fold concentration of PI-PLC did not enhance significantly the initial release rate, which was about 240 times lower than that of the preceding digestion (2.4×10^{-3} % of the membrane-bound activity released/min per unit of PI-PLC) (Fig. 7*a*).

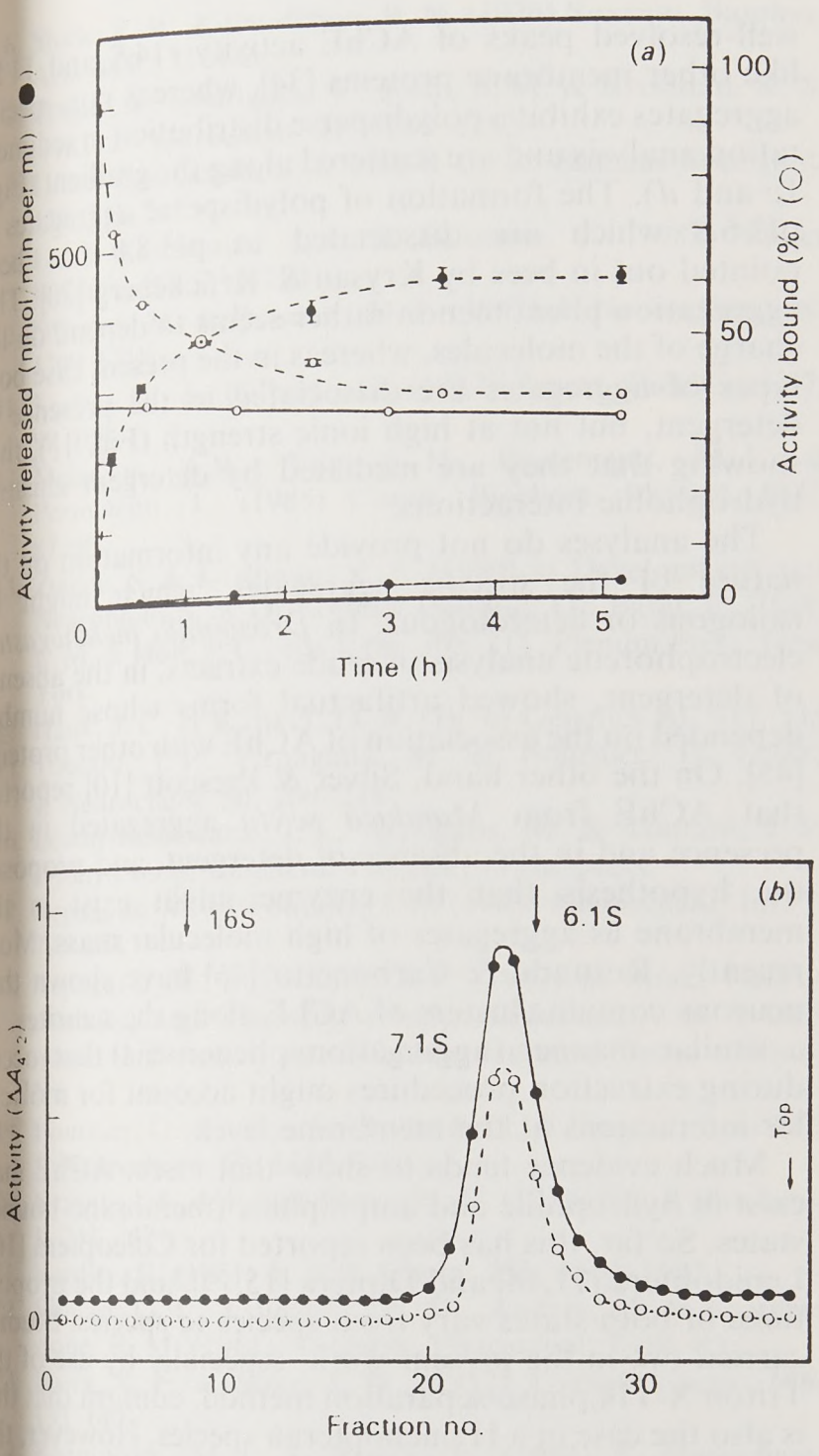


Fig. 7. Solubilization of membrane AChE by PI-PLC

Membrane-bound AChE from a 30000 *g* membrane pellet resuspended in low-salt buffer containing 0.1 mg of bacitracin/ml, 103 units of aprotinin/ml, 20 μg of pepstatin/ml and 5 μg of leupeptin/ml was submitted to digestion by PI-PLC (5 units/ml) at 22 °C. (*a*) At different times of the digestion, samples were removed and centrifuged at 165000 *g* for 5 min. The activity of the supernatant was assayed and corrected by the activity of the blank without PI-PLC (●——●). AChE remaining bound on the membrane fraction was expressed as a percentage of the initial membrane-bound activity (○——○). After 5.5 h, the digestion mixture was centrifuged for 20 min at 30000 *g*, and the pellet washed, resuspended and centrifuged again. The pellet was resuspended in the low-salt buffer containing the anti-proteolytic agents and supplemented with PI-PLC at 15 units/ml. At different times samples were processed as above and the activity in the supernatant was assayed and corrected by the blank activity (●——●); (○——○), percentage of the initial membrane-bound activity. (*b*) After 5.5 h hydrolysis by PI-PLC, the remaining digestion mixture was centrifuged at 30000 *g* for 20 min and the supernatant was subjected three times to Triton X-114 phase separation. The aqueous phase was sedimented on a sucrose gradient made in low-salt buffer in the presence (●) or in the absence (○) of 1% Lubrol PX. The membrane-bound AChE was assayed by measuring the activity in the digestion mixture before and after centrifugation.

PI-PLC converted the amphiphilic AChE into a hydrophilic form, since no loss of activity was observed in the aqueous phase after three runs of Triton X-114 phase separation. Sedimentation analysis of the aqueous phase showed that the hydrolysis product had a hydrodynamic behaviour very close to that of the 7 S form previously characterized. It sedimented at 7.1 S either in the presence or in the absence of detergent (Fig. 7*b*).

DISCUSSION

Accurate analysis of bee head AChE has allowed the characterization of at least two distinct molecular forms. The major membrane form interacts with detergents and corresponds to 94–97% of the total activity. It sediments at 5 S in high-salt detergent conditions and 6 S in low-salt detergent conditions (Fig. 1). The sedimentation shift found between low-salt and high-salt detergent conditions appears only to be the consequence of the interaction with the detergent, whose micelles enhance the molecular volume, resulting in a change in the apparent density of the enzyme [1,12,26]. The increase in the molecular volume by interaction with detergent is not negligible, since an average of 106 molecules of detergent aggregate per micelle of Lubrol PX, which corresponds to an absolute molecular mass of 64000 Da [27].

The second, minor, form is hydrophilic and corresponds to 4.5 ± 1.5% of the total activity. It is well characterized in non-denaturing electrophoresis and is not observed in sedimentation analysis in detergent conditions, because it is low in quantity when compared with the 5 S/6 S form and because its sedimentation coefficient is close to that of the 5 S/6 S form. The hydrophilic AChE of *Pieris brassicae* is a 7.3 S enzyme and accounts for 20–40% of the total activity [17]. Solubilization by autolysis has been found to produce a 7.3 S or 7.4 S detergent-insensitive enzyme in bee heads [20], house-fly heads [28,29] or thoraces [30], which have the same molecular mass as the major fraction of the native soluble form [31]. Thus the hydrophilic minor form characterized here corresponds very probably to the 7.3 S AChE solubilized by autolysis which has been characterized by Krysan & Kruckeberg [20]. The hydrodynamic behaviour of the 7.1 S form released by PI-PLC may suggest that the minor hydrophilic AChE might be a digestion product of endogenous phospholipase. At the present time, it is not possible to know whether the hydrophilic form results from biosynthetic or secretory events, or from phospholipase or proteinase digestions.

The presence of a light form is not excluded, since in some low-salt extracts a small peak of activity at about 4.3 S is seen (Fig. 1*d*), but no additional study has been carried out.

Proteins associated with membranes can be mainly classified into two categories: extrinsic or peripheral proteins, presumably bound to membranes by polar interactions, and integral or intrinsic membrane proteins, which appear to have an amphiphilic structure. The amphiphilic character depends on the existence of two domains in the same molecule: one, mainly hydrophilic, that contains the catalytic site in the case of AChE, and a second, mainly hydrophobic, that may interact with detergent molecules, phospholipids, hydrophobic molecules or itself [27,32–34]. The hydrophobic domain ensures the anchoring of the enzyme in the plasma

membrane. According to this principle, the 5 S/6 S form may be classified as an amphiphilic enzyme, like integral membrane proteins, on the basis of its aggregation upon removal of detergent and on its recovery in the detergent phase after Triton X-114 phase separation. On the contrary, the 7 S minor form does not interact with Triton X-114 and remains in the aqueous phase, and may be classified as a hydrophilic enzyme, like fully soluble proteins [21,32,33]. Similar results have been obtained in *Drosophila melanogaster* and *Pieris brassicae* [15,17] by using the charge-shift electrophoresis method [35].

The involvement of phosphatidylinositol in the anchoring mode of various membrane proteins is now well established (for reviews, see [36–38]). Globular AChE from different vertebrates have been solubilized mainly by PI-PLC from *Staphylococcus aureus* or alternatively by PI-PLC from *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* and *Trypanosoma brucei* (for review, see [39]). Recently, it has been reported that the amphiphilic AChE dimer from *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* is susceptible to the action of PI-PLC from *B. cereus* and can be fully converted into a hydrophilic form [40]. In the present study, about 60% of bee AChE is easily solubilized by PI-PLC from *B. thuringiensis*. The conversion of the 5 S/6 S amphiphilic form into a 7 S hydrophilic one demonstrates that the releasing effect of PI-PLC is not due to a disruptive effect on membrane structure, such as microvesiculation [38]. By contrast, about 40% of the membrane AChE exhibits a very low susceptibility to PI-PLC. Re-digestion experiments show that this weak solubilizing effect is not due to enzyme inactivation, or to inhibition by the hydrolysis products. The existence of a PI-PLC-resistant fraction is not restricted to insects, since only 5–10% of AChE from human or mouse erythrocyte is solubilized by *S. aureus* PI-PLC [41,42]. Moreover, various brain regions of different mammalian species exhibit totally resistant AChE [42]. The partial solubilization of AChE and the presence of a PI-PLC-resistant fraction might suggest the involvement of an alternative anchoring mode, such as a transmembrane polypeptide. In fact, these data must be interpreted with care, because little is known on interactions of AChE with other membrane proteins and on accessibility problems that could result. It has been suggested that an apparent PI-PLC-resistance might also be due to the binding of the released AChE to a putative glycosylinositol phosphate 'receptor' [38]. In a recent study, evidence is given that structural modifications in the glycolipid anchor of erythrocyte AChE and DAF (Decay-Accelerating Factor) could induce a resistance to PI-PLC [43]. Similarly, the differential susceptibility of human and bovine erythrocyte AChE to PI-PLC arises from structural differences in their glycolipid anchor [44]. Hence, PI-PLC-sensitive AChE could co-exist with forms linked to a PI-PLC-resistant phosphatidylinositol anchor, and thus would explain the 40% PI-PLC-resistant fraction observed in the bee.

The bee head membrane AChE solubilized in the absence of detergent occurs in two types of aggregates: (i) non-specific aggregates, which probably correspond to the association with different membrane proteins and which are characterized mainly by their fast-sedimenting AChE activity; (ii) specific aggregates, which are responsible for the apparent polymorphism observed in detergent-free extracts. These specific aggregates are found in well-resolved peaks of AChE activity (14 S and 1 like other membrane proteins [34], whereas non-spe aggregates exhibit a polydisperse distribution in sedi tation analysis and are scattered along the gradient (F 1*c* and *d*). The formation of polydisperse aggregate pH 6.8 which are dissociated at pH 8.0 has b pointed out in bees by Krysan & Kruckeberg [20]. aggregation phenomenon rather seems to depend on charge of the molecules, whereas in the present case types of aggregates are dissociated in the presence detergent, but not at high ionic strength (Fig. 1c), showing that they are mediated by detergent-sens hydrophobic interactions.

The analyses do not provide any information on nature of the specific aggregates, which might isologous or heterologous. In *Drosophila melanoga* electrophoretic analysis of crude extracts, in the abs of detergent, showed artifactual forms whose num depended on the association of AChE with other prot [45]. On the other hand, Silver & Prescott [10] repor that AChE from *Manduca sexta* aggregated in presence and in the absence of detergent, and propo the hypothesis that the enzyme might exist in membrane as aggregates of high molecular mass. M recently, Rotundo & Carbonetto [46] have shown neurons contain clusters of AChE along the neurites a similar manner, aggregation phenomena that oc during extraction procedures might account for mole lar interactions at the membrane level.

Much evidence tends to show that insect AChE exist in hydrophilic and amphiphilic (membrane-bou states. So far, this has been reported for Coleoptera Lepidoptera [17,18] and Diptera [15,19], and the prop tions of both states vary from species to species. Stud carried out in the present work, especially by use of Triton X-114 phase-separation method, confirm that is also the case in a Hymenopteran species. However, possible function of the hydrophilic form remains obsc in all cases. The hydrophilic variant might result fr lytic as well as secretory phenomena. It is very likely t both these cases correspond to a part of the reality, that very subtle differences occur within the hydroph components.

We thank Dr. Martine Arpagaus, Dr. Jean-Baptiste Be Dr. Jean-Jacques Lenoir-Rousseaux and Professor Jacq Marvaldi for their constructive advice and their critical read of the manuscript. We acknowledge Dr. G. Rougon for the g of PI-PLC. We are also very grateful to the Paris brothers Thierry Andrieu for expert bee-keeping, and to Jean-M Cornuet and Jean Royère for their help in the preparation the manuscript.

REFERENCES

1. Massoulié, J. & Bon, S. (1982) Annu. Rev. Neurosci 57–106
2. Rosenberry, T. L. (1985) in Enzymes in Biolog Membranes, 2nd edn. (Martonosi, A. N., ed.), pp. 403-4 Plenum Press, New York
3. Vigny, M., Bon, S., Massoulié, J. & Gisiger, V. (19 J. Neurochem. **33**, 559–565
4. Bon, S., Vigny, M. & Massoulié, J. (1979) Proc. N Acad. Sci. U.S.A. **76**, 2546–2550
5. Tripathi, R. K., Telford, J. N. & O'Brien, R. D. (19 Biochim. Biophys. Acta **525**, 103–111

6. Steele, R. W. & Smallman, B. N. (1976) Biochim. Biophys. Acta **445**, 131–146
7. Zingde, S., Rodrigues, V., Joshi, S. M. & Krishnan, K. S. (1983) J. Neurochem. **41**, 1243–1252
8. Lenoir-Rousseaux, J. J. (1985) C. R. Seances Soc. Biol. **179**, 741–747
9. Lenoir-Rousseaux, J. J. & Gautron, J. (1987) Insect Biochem. **17**, 739–750
10. Silver, L. H. & Prescott, D. J. (1982) J. Neurochem. **38**, 1709–1718
11. Lester, D. & Gilbert, L. (1987) Insect Biochem. **17**, 99–109
12. Melanson, S. W., Yun, C. H., Pezzementi, M. L. & Pezzementi, L. (1985) Comp. Biochem. Physiol. **81C**, 87–96
13. Zingde, S. & Krishnan, K. S. (1980) in Development and Neurobiology of Drosophila (Siddiqi, O., Babu, P., Hall, L. M. & Hall, J. C., eds.), pp. 305–311, Plenum Press, New York
14. Hank, J. C. & Kankel, D. B. (1976) Genetics **83**, 517–535
15. Toutant, J. P., Arpagaus, M. & Fournier, D. (1988) J. Neurochem. **50**, 209–218
16. Lenoir-Rousseaux, J. J., Arpagaus, M. & Toutant, J. P. (1988) Comp. Biochem. Physiol., in the press
17. Arpagaus, M. & Toutant, J. P. (1985) Neurochem. Int. **7**, 793–804
18. Arpagaus, M. & Toutant, J. P. (1987) in Insect Neurochemistry and Neurophysiology (Borkovec, A. B. & Gelmans, D. B., eds.), pp. 243–246, Humana Press, Clifton, NJ
19. Fournier, D., Cuany, A., Bride, J. M. & Bergé, J. B. (1987) J. Neurochem. **49**, 1455–1461
20. Krysan, J. L. & Kruckeberg, W. C. (1970) Int. J. Biochem. **1**, 241–247
21. Bordier, C. (1981) J. Biol. Chem. **256**, 1604–1607
22. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Featherstone, R. M. (1961) Biochem. Pharmacol. **7**, 88–95
23. Beers, R. F. & Sizer, I. W. (1952) J. Biol. Chem. **195**, 133–140
24. Karnovsky, M. J. & Roots, L. (1964) J. Histochem. Cytochem. **12**, 219–221
25. Bon, S. & Massoulié, J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **77**, 4464–4468
26. Ott, P., Jenny, B. & Brodbeck, U. (1975) Eur. J. Biochem. **57**, 469–480
27. Tanford, C. & Reynolds, J. A. (1976) Biochim. Biophys. Acta **457**, 133–170
28. Krysan, J. L. & Chadwick, L. E. (1966) J. Insect Physiol. **12**, 781–787
29. Steele, R. W. & Smallman, B. N. (1976) Biochim. Biophys. Acta **445**, 131–146
30. Steele, R. W. & Smallman, B. N. (1976) Life Sci. **19**, 1937–1942
31. Krysan, J. L. & Chadwick, L. E. (1970) J. Insect Physiol. **16**, 75–82
32. Singer, S. J. (1974) Annu. Rev. Biochem. **43**, 805–833
33. Helenius, A. & Simons, K. (1975) Biochim. Biophys. Acta **415**, 29–79
34. Simons, K., Helenius, A., Leonard, K., Sarvas, M. & Gething, M. J. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**, 5306–5310
35. Helenius, A. & Simons, K. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74**, 529–532
36. Low, M. G., Ferguson, M. A. G., Futerman, A. H. & Silman, I. (1986) Trends Biochem. Sci. **11**, 212–215
37. Cross, G. A. M. (1987) Cell **48**, 179–181
38. Low, M. G. (1987) Biochem. J. **244**, 1–13
39. Silman, I. & Futerman, A. (1987) Eur. J. Biochem. **170**, 11–22
40. Fournier, D., Bergé, J. B., Cardoso de Almeida, M.-L. & Bordier, C. (1988) J. Neurochem. **50**, 1158–1163
41. Low, M. G. & Finean, J. B. (1977) FEBS Lett. **82**, 143–146
42. Futerman, A. H., Low, M. G., Michaelson, D. M. & Silman, I. (1985) J. Neurochem. **45**, 1487–1494
43. Medof, M. E., Walter, E. I., Roberts, W. L., Haas, R. & Rosenberry, T. L. (1986) Biochemistry **25**, 6740–6747
44. Roberts, W. L., Kim, B. H. & Rosenberry, T. L. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**, 7817–7821
45. Morton, R. A. & Singh, R. W. (1981) Biochem. Genet. **20**, 179–198
46. Rotundo, R. L. & Carbonetto, S. T. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**, 2063–2067

Received 16 February 1988/10 May 1988; accepted 24 May 1988

Insect Biochem. Vol. 18, No. 8, pp. 811–819, 1988
Printed in Great Britain. All rights reserved

0020-1790/88 $3.00 + 0.00
Copyright © 1988 Pergamon Press plc

PROPERTIES OF ACETYLCHOLINESTERASE FROM *APIS MELLIFERA* HEADS

LUC P. BELZUNCES,[1]* JEAN-JACQUES LENOIR-ROUSSEAUX[2] and MICHEL BOUNIAS[1]
[1]INRA, Domaine Saint Paul, Laboratoire de Biochimie, B.P. 91, 84140 Montfavet and
[2]Université de Paris XII, Avenue du Général de Gaulle, Laboratoire de Biologie Animale, 94010 Créteil, France

(*Received* 8 *March* 1988; *revised and accepted* 29 *June* 1988)

Abstract—AChE (EC 3.1.1.7) from the bee *Apis mellifera* head was solubilized by different extraction procedures. Buffers containing the non-ionic detergent Lubrol-PX were more efficient for solubilizing the enzyme and exhibited little inactivation effect when compared with Triton X-100-containing buffers. The acetylthiocholine-splitting activity was shown to be that of true AChE on the basis of inhibitor sensitivity and substrate inhibition. The enzyme from Lubrol-containing and detergent-free extracts had an optimum pH for activity of 9 and 8.7, respectively. The optimum temperature for activity was 45°C. The Arrhenius plot showed that the enzyme has an activation energy of 26 ± 0.8 kJ mol^{-1}. Bee head AChE was susceptible to the presence of divalent cations but monovalent cations such as Na^+ and K^+ did not induce any inhibitory effect at concentrations up to 1 M. By contrast, they exhibited an activation effect with a maximum at 0.2 M. Histochemical localization for AChE on frozen sections of honeybees confirmed its specificity as true AChE by the use of specific inhibitors such as iso-OMPA, BW284C51 and eserine. The main AChE activity was located in the neuropil appearing as diffused or clumped dots. An AChE activity coating nuclei of neurones and glial cells in the vicinity of the neuropile was detected with Koelle's reaction. Such a distribution suggests different sites for synthesis, storage, transit and secretion for AChE in the brain.

Key Word Index: acetylcholinesterase, insect, bee, solubilization

INTRODUCTION

Acetylcholinesterases (AChE, EC 3.1.1.7) occur in vertebrates in six distinct molecular forms (see Massoulié and Bon, 1982; Rosenberry, 1985, for reviews). The globular acetylcholinesterases, which include amphiphilic membrane-bound forms, require detergent for solubilization (Bon *et al.*, 1979; Vigny *et al.*, 1979) and they possess a hydrophobic domain that allows them to anchor in the cell membrane (Low and Finean, 1977; Hall and Brodbeck, 1978; Dutta-Choudhury and Rosenberry, 1984; Haas *et al.*, 1986). These forms represent monomeric (G1), dimeric (G2) and tetrameric (G4) associations of catalytic subunits. These molecules also occur in detergent-insensitive counterparts called hydrophilic acetylcholinesterases (Lazar and Vigny, 1980; Grassi *et al.*, 1982). The asymmetric forms correspond to one, two or three tetramers of catalytic subunits associated with a collagen-like tail, termed A4, A8 and A12 acetylcholinesterases, respectively (Bon *et al.*, 1979).

Insect AChE has been the subject of numerous studies in recent years [see Chadwick (1963), Smallman and Mansingh (1969) and Eldefrawi (1985) for reviews]. This enzyme is of particular importance as target of organophosphate and carbamate pesticides (Chadwick, 1963) and knowledge on its control of biosynthesis, regulation and structure might help in the fight against insect pests and in the safeguarding of beneficial pollinators such as bees. However, little is known of the properties (Metcalf and March, 1950; Kunkee and Zweig, 1963), the polymorphism (Krysan and Kruckeberg, 1970), the structure, the regulation and the biosynthesis of the bee head AChE. Histochemical studies have shown that bee AChE activity is unevenly distributed along the visual fibres in the compound eye (Kral and Schneider, 1981) and in the ocellar tract (Kral, 1984). The main question about the structural localization of AChE in such a tissue as the brain concerns its biosynthesis, translocation and storage. In other words, by which kind of cells, neurons or glial cells, AChE is produced, since this enzyme is rather a secreted glycoprotein than an integral membrane protein (Taylor *et al.*, 1987).

Usually localized in the neuropil, the connecting region between neuron to neuron, are AChE molecules elaborated in the pericaryon and eventually stored in the nuclear envelope and then transited or secreted to the connecting region? In this histochemical localization of AChE, we will refer to the "neapolitan ice cream" description of the brain of the honeybee in respect to the functional area published by Mobbs (1985).

In the present paper we report preliminary studies on bee head AChE solubilized by different extraction procedures in order to facilitate more elaborate sub-

*To whom correspondence should be addressed.

Abbreviations used: AChE, Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7); AcSCh, Acetylthiocholine iodide; BW284C51, 1.5-bis(4-allyldimethylammonium phenyl) pentan-3-one dibromide; DTNB, 5.5′dithio-bis-(2 nitrobenzoic acid); EDTA, Ethylenediamine tetraacetic acid; iso-OMPA, Tetraisopropyl pyrophosphoramide; SDS, Sodium dodecylsulphate.

Table 1. Effect of the composition of the extraction medium on the solubilization of bee head AChE. The values represent mean ± standard deviation. Values in parentheses correspond to the number of determinations. Triton X-100 and Lubrol-PX were used at the concentration of 1% (w/v). LS, Low-salt, HS, High-salt; ND, Not determined

	Extent of solubilization (% of total activity)	Specific activity (μmol/h/mg of protein)	Activity/g of wet tissue (μmol/min/g)
LS-Triton	81 ± 0.0 (2)	12.42 ± 0.00 (3)	12.28 ± 0.00 (2)
HS-Triton	83 ± 3.7 (4)	10.38 ± 0.00 (3)	16.44 ± 1.45 (4)
LS	14 ± 3.0 (4)	2.76 ± 0.26 (6)	1.56 ± 0.07 (4)
HS	22.1 ± 0.1 (5)	2.82 ± 0.51 (6)	3.21 ± 0.18 (5)
LS-Lubrol	82 ± 11.4 (4)	9.10 ± 4.97 (6)	10.1 ± 4.53 (4)
HS-Lubrol	98 ± 0.0 (4)	12.28 ± 0.29 (6)	15.59 ± 3.44 (4)
HS-Lubrol 5 mM EDTA	91 ± 0.0 (2)	11.10 ± 0.00 (3)	ND

sequent works. We also report an original localization of the enzyme in the bee head.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Lubrol-PX, BW284C51, iso-OMPA, Eserine hemisulphate salt (Physostigmine), Ethopropazine, DTNB, AcSCh and bovine serum albumine were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo.). Triton X-100 was obtained from Merck (Darmstadt).

Solubilization of acetylcholinesterase

All steps were carried out between 0-4°C. Adult bees were CO_2-anaesthetized and heads were severed from the body. The heads were immediately homogenized with a glass Potter homogenizer in the appropriate buffer to make a 10% (w/v) extract. The homogenate was filtered through cheese-cloth and centrifuged for 30 min at 10,000 *g*. The post-mitochondrial 10,000 *g* supernatant was collected and the pellet re-extracted and centrifuged twice as above. The three 10,000 *g* supernatants were pooled and centrifuged for 1 h at 100,000 *g*. The 100,000 *g* supernatant was saved and used for analysis. This method of extraction allows a rapid assessment of the amount of AChE in the low-sedimenting and fast-sedimenting subcellular structures. The yield of AChE extraction was estimated by assaying the enzyme from the 100,000 *g* supernatant, and from the 10,000 *g* and the microsomal 100,000 *g* resuspended pellets. Different buffers were used for extraction procedures. High-salt detergent-containing buffer (high-salt Lubrol buffer): 1 M NaCl, 1% (w/v) Lubrol-PX and 10^{-2} M Tris–Cl pH 7.2. High-salt buffer: 1 M NaCl, 10^{-2} M Tris–Cl pH 7.2. Low-salt detergent-containing buffer (Low-salt Lubrol buffer): 10^{-2} M NaCl, 1% Lubrol-PX, 10^{-2} M Tris Cl pH 7.2. Low-salt buffer: 10^{-2} M NaCl, 10^{-2} M Tris–Cl pH 7.2. All media were freshly made and were sterile.

Enzyme assay

AChE was assayed at 20°C by the method of Ellman *et al.* (1961). The assay medium (1 ml) consisted of 15×10^{-4} M DTNB, 3×10^{-4} M AcSCh in 8×10^{-2} M Tris–Cl pH 8.0. The reaction rate was monitored spectrophotometrically by the absorbance increase at 412 nm.

Protein assay

The protein concentrations were determined according to the method of Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumine as the standard.

Inhibitor specificity studies

AChE was incubated in the assay medium, in the absence of substrate, for 20 min at 4°C and for 10 min at 20°C with the appropriate concentrations of inhibitor. Then, the enzymic activity was assayed at 20°C by adding AcSCh to a final concentration of 3×10^{-4} M. The susceptibility of AChE to BW284C51, eserine, ethopropazine and iso-OMPA was studied.

Effect of pH on AChE activity

AChE was incubated in 4×10^{-2} M phosphate buffers whose pH ranged from 5 to 11, in the presence of 3×10^{-4} M acetylthiocholine. The enzymic hydrolysis was ended by adding a SDS solution buffered with 0.5 M phosphate pH 7.5 to obtain final concentrations of 0.3% (w/v) SDS. Following the addition of phosphate buffer the pH ranged from 7.4 to 7.6. Then, DTNB was added to a final concentration of 15×10^{-4} M and the absorbance was measured at 412 nm against an appropriate blank without enzyme.

Histochemical localization

Frozen (below −18°C) transverse sections (to the antero-dorsal axis) of 10 μm from nitrogen-frozen young honeybee workers were performed according to the method of Koelle and Friendwald (1949) modified by Couteaux and Taxi (1952). Sections were collected on coated cover slides with 0.1% gelatin and kept at 4°C under light vacuum. The incubation medium was buffered with 0.1 M phosphate at pH 7. Sections were incubated from 20 to 60 min with AcSCh as substrate and post-fixed with 10% formaldehyde before ammonium sulphide treatment (20 times diluted). Inhibitors, iso-OMPA, BW284C51, eserine were added to the pre-incubation and incubation media at 10^{-5} M. Fixed sections were topographically stained with hemalun before mounting in water-mounting media (GURR) for observation with a Zeiss Ultrophot camera with a 25 iso-Agfa film. In such pictures the brownly spots for AChE contrast with the faint blue of hemalun-stained nuclei.

Frozen frontal sections were also performed according to the Karnovsky and Roots technique for 2 min with or without eserine 10^{-6} M (supplied by J. P. Toutant, INRA Montpellier) and mounted in Entellan after dehydrated.

RESULTS

Properties of bee acetylcholinesterase

The results expressed in Table 1 show that a 98% extraction rate of AChE from bee head was obtained using high-salt Lubrol buffer against 83% using high-salt Triton X-100 buffer. The sp. act. was 12.2 μmol of substrate hydrolysed/h/mg of protein. Low-salt Lubrol buffer, high-salt buffer and low-salt buffer gave respectively, 82, 22 and 14% efficiencies.

The results illustrated in Fig. 1 show that cholinesterase activity, solubilized in high-salt conditions either in the presence or in the absence of Lubrol-PX,

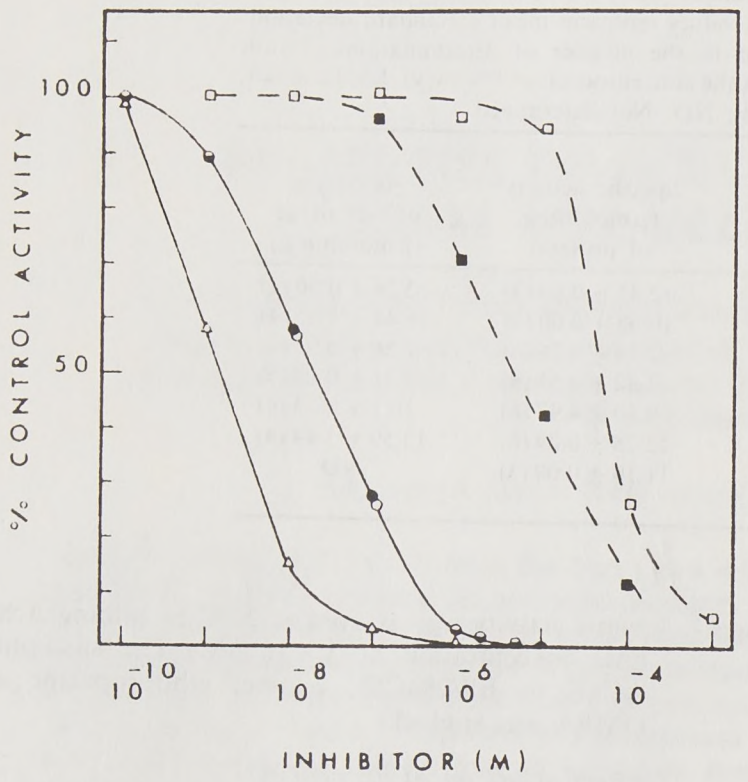


Fig. 1. Inhibitor specificities of bee AChE solubilized by different extraction procedures: BW284C51, high-salt Lubrol extract (●); BW284C51, high-salt detergent-free extract (○); ethopropazine, high-salt Lubrol extract (■); eserine, high-salt Lubrol extract (△); iso-OMPA, high-salt Lubrol extract (□). Activities are expressed as the percentage of activity in the absence of inhibitor.

was completely inhibited at 10^{-6} M eserine, an inhibitor of all cholinesterases, and 10^{-5} M BW284C51, a specific inhibitor of AChE, showing that no pseudo-cholinesterase activity (EC 3.1.1.8) contributed to the hydrolysis of acetylthiocholine. Ethopropazine and iso-OMPA, which are inhibitors of pseudo-cholinesterases, exhibited weak inhibitory effects at 10^{-6} and 10^{-5} M. In addition, bee cholinesterase from a high-salt Lubrol extract exhibited a substrate inhibition at concentrations above

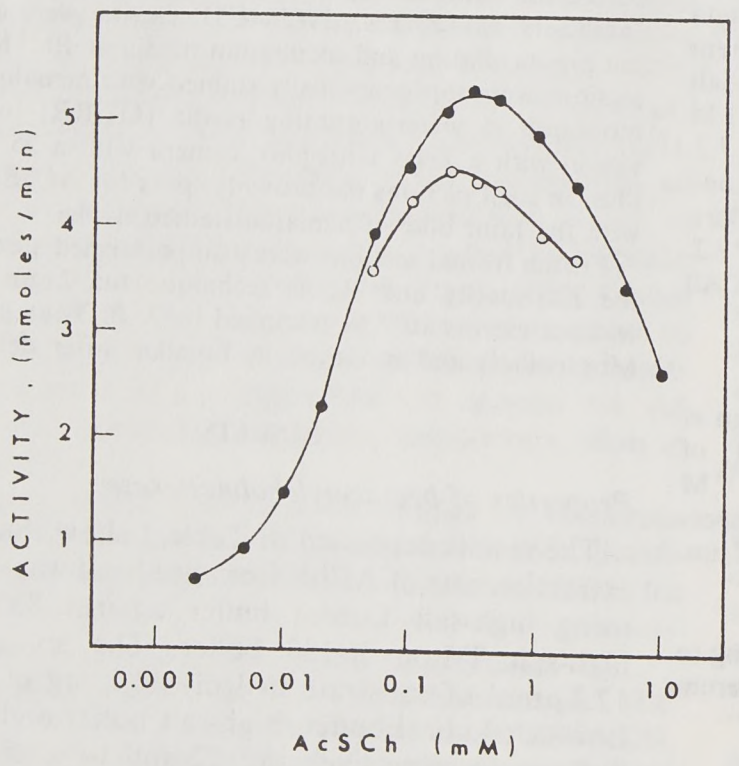


Fig. 2. Effect of substrate concentration on AChE activity from high-salt Lubrol extracts (○), or high-salt detergent-free extracts (●). Activities are expressed in nmol of AcSCh hydrolysed/min.

Bee head acetylcholinesterase

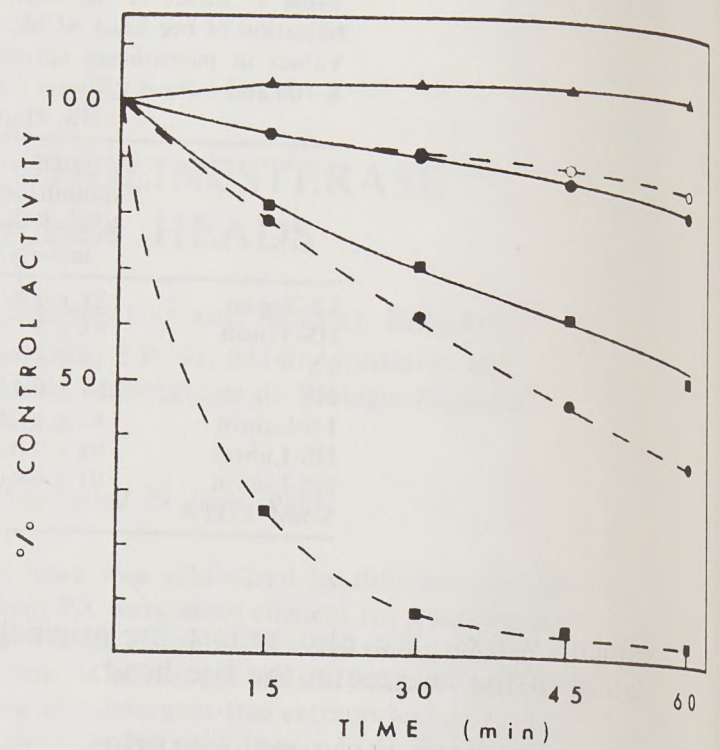


Fig. 3. Effect of detergents on AChE activity. AChE 20 µl, from high-salt detergent extract stored at 4°C, corresponding to 15 nmol of acetylthiocholine hydrolysed/min, were incubated at 30°C in the assay medium, without substrate, for different times before assay. High-salt Lubrol extract in the presence and in the absence of 1% Lubrol in the assay medium (●——●); high-salt Lubrol extract incubated at 25°C instead of 30°C (○ - - ○); high-salt Lubrol extract in the presence of 0.2 M KCl in the assay medium (●---●); high-salt Triton X-100 extract (■——■); high-salt Triton X-100 extract in the presence of 0.2 M KCl in the assay medium (■ - - ■); high-salt detergent-free extract (▲——▲). Activities are expressed as a percentage of the activity at 0 min incubation time.

3×10^{-4} M acetylthiocholine like AChE (Fig. 2). The K_m value estimated from Augustinsson and Hanes plot was 57 ± 4.1 µM for AChE from high-salt Lubrol extracts and 29.7 ± 1.1 µM for AChE from high-salt extracts. The cholinesterase activity present in bee head extracts thus corresponded to acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) with respect to specific inhibitor sensitivity and substrate inhibition.

AChE activity was altered in the presence of detergent. The results expressed in Fig. 3 show that 1 h of incubation at 30°C of the AChE from the high-salt Lubrol extract resulted in a loss of about 14% of the activity. This inactivation was not due to the dilution of detergent since identical results were found when the assay medium was supplemented with 1% Lubrol. The non-ionic detergent Triton X-100 induced a more rapid inactivation than Lubrol-PX since 1 h of incubation resulted in a loss of activity of about 50%. A slightly lower inactivation effect was observed when the extracts were incubated at 25°C instead of 30°C. The presence of 0.2 M KCl in the assay medium dramatically increased the inactivation process since after 45 min of incubation at 30°C, over 90% of the activity was lost in the case of Triton X-100 extract, and about 60% of the activity was lost after 1 h incubation at 30°C in the case of the Lubrol extract. No inactivation effect was observed when the detergent-free extract was incubated at 30°C, thus confirming that the presence of detergent promotes this loss of activity. No loss of activity was found during storage at 4°C for 1 week,

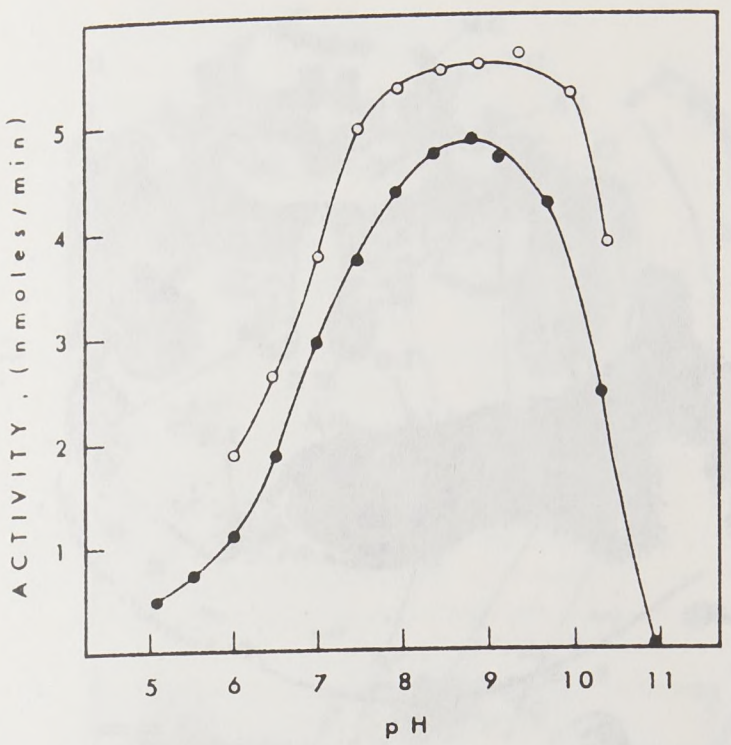


Fig. 4. Effect of pH on AChE activity from high-salt Lubrol extracts (○), and high-salt detergent-free extracts (●). Activities are expressed in nmol of AcSCh hydrolysed/min. For experimental details see Materials and Methods section.

and cooling at 4°C of an extract previously incubated at 30°C, results in the complete recovery of the activity. Since Lubrol-PX produced a more efficient solubilization and a lower inactivation effect of the enzyme, we used this detergent instead of Triton X-100 for solubilization of bee head AChE.

The optimum pH for activity and the thermal sensitivity of AChE from crude extracts were also investigated. The thermal sensitivity of bee AChE was studied using detergent-free extracts because it has been shown that, at temperatures below 45°C, the enzyme in the presence of detergent underwent a temperature-dependent inactivation during the time as its activity remained stable in the absence of detergent (Fig. 3). In the conditions of the experiment, bee AChE from high-salt Lubrol-containing and detergent-free extracts had an optimum pH of 9 and 8.7, respectively (Fig. 4). The optimum temperature for activity was 45°C and above this value the enzyme underwent a rapid inactivation (Fig. 5A). The activation energy, determined from Arrhenius plot, was 26 ± 0.8 kJ mol^{-1} (Fig. 5B).

Since in the presence of detergent the enzyme undergoes an inactivation which is highly dependent on the presence of salts (Fig. 3), the sensitivity of AChE to various inorganic cations was studied using detergent-free extracts. After solubilization, low-salt extracts were extensively dialysed against 10^{-2} M Tris–Cl buffer to remove any traces of ions, and then incubated with various concentrations of different salts (Fig. 6). It was observed that the enzyme was very susceptible to the presence of divalent cations such as Mn^{2+}, Mg^{2+} and Ca^{2+}. A concentration of 5×10^{-3} M Mn^{2+} completely inhibited the AChE activity while concentrations of about 5×10^{-2} M and 0.1 M of Ca^{2+} and Mg^{2+}, respectively, were necessary to produce this effect. In the case of monovalent cations such as Na^+ and K^+, no inhibitory effect was found for concentrations up to 1 M, but an activating effect was observed at 0.2 M.

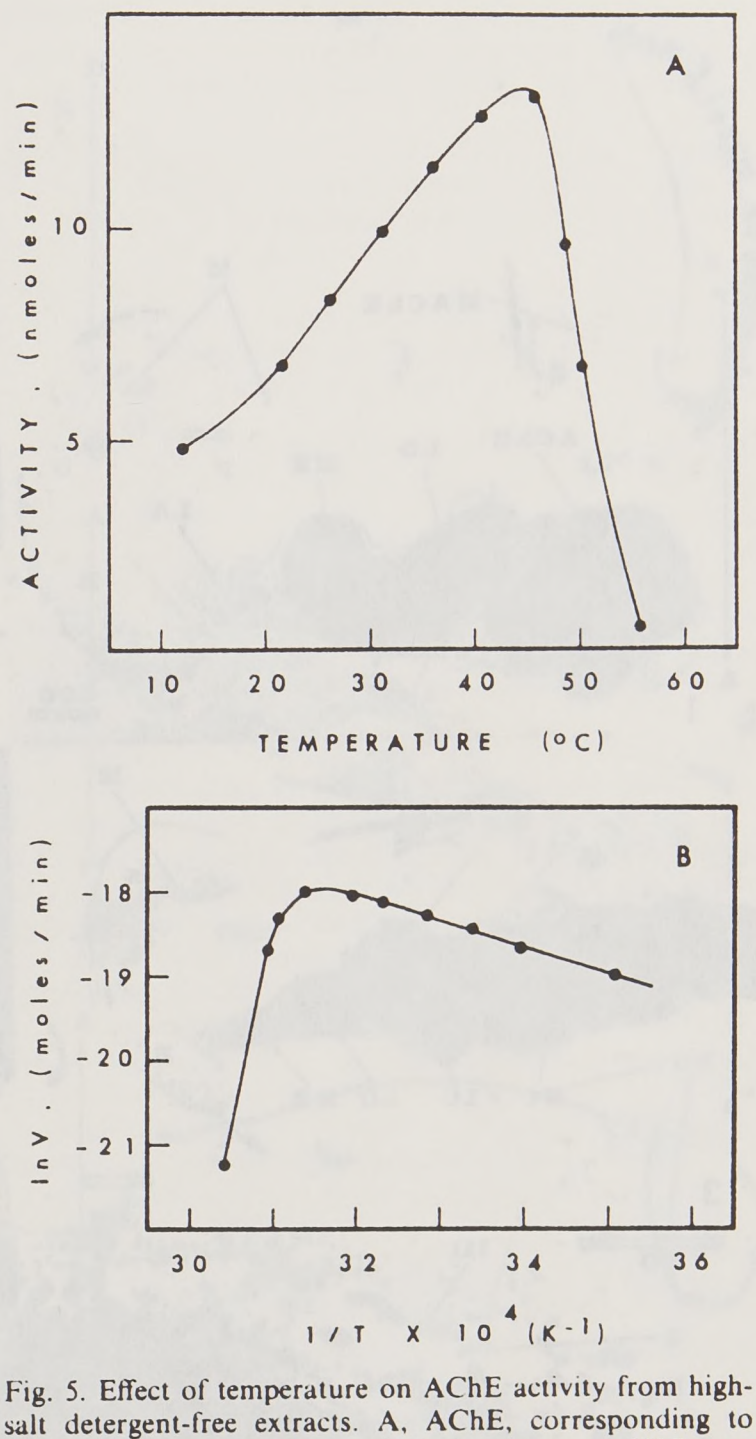


Fig. 5. Effect of temperature on AChE activity from high-salt detergent-free extracts. A, AChE, corresponding to 10 nmol of acetylthiocholine hydrolysed/min at 30°C, was incubated for 5 min in the assay medium, without substrate, at different temperatures before assay. The activities were measured at the incubation temperatures and are expressed in nmol of AcSCh hydrolysed/min. B, Arrhenius plot.

It is intersting to note that the concentration of 0.2 M K^+, which activated the enzyme solubilized in detergent-free conditions, enhanced the inactivation effect due to the presence of detergent (Fig. 3).

Histochemical localization and specificity

Koelle's reaction revealed that enzymatic activity was mainly concentrated in the neuropil region of the calix, the glomeruli of the antennal lobes and the optic lobes except the lamina (Fig. 7, plates 1–3). The reactivity of AChE in the neuropil appeared in different patterns. The spots of AChE activity are dense and reticulated in the neuropil centre, whereas they are less packed up in the surrounding area and appeared as scattered spots, as seen in the plates 5 and 6 of the Fig. 7.

At higher magnification, the Koelle's reaction for AChE in the presence of 10^{-5} M iso-OMPA appeared, as revealed with hemalun, as tiny dots coating the nucleus stain of either neurons and glial cells located close to the neuropil (Fig. 7, plates 4 and 5).

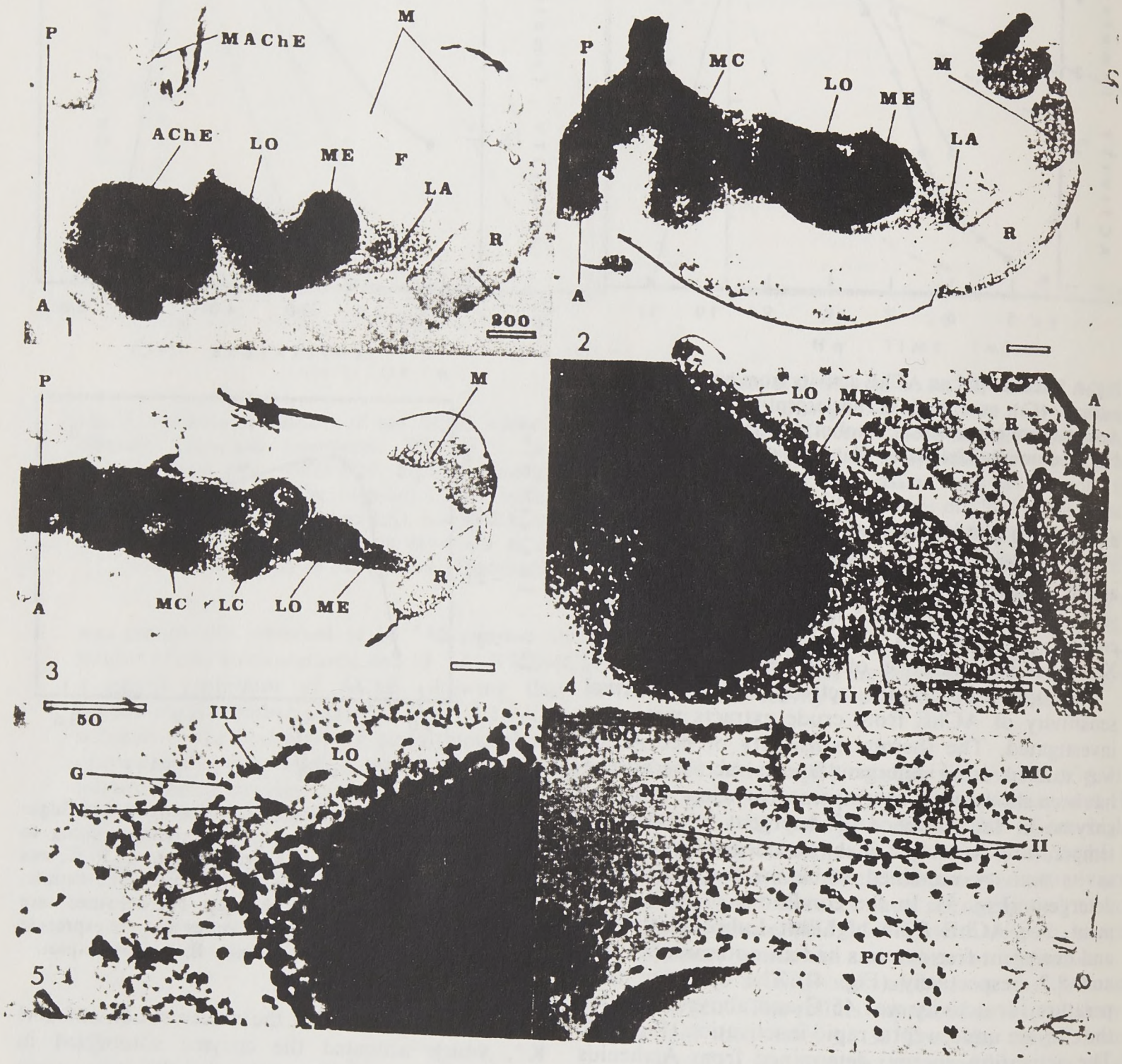


Fig. 7. (plates 1 to 6).

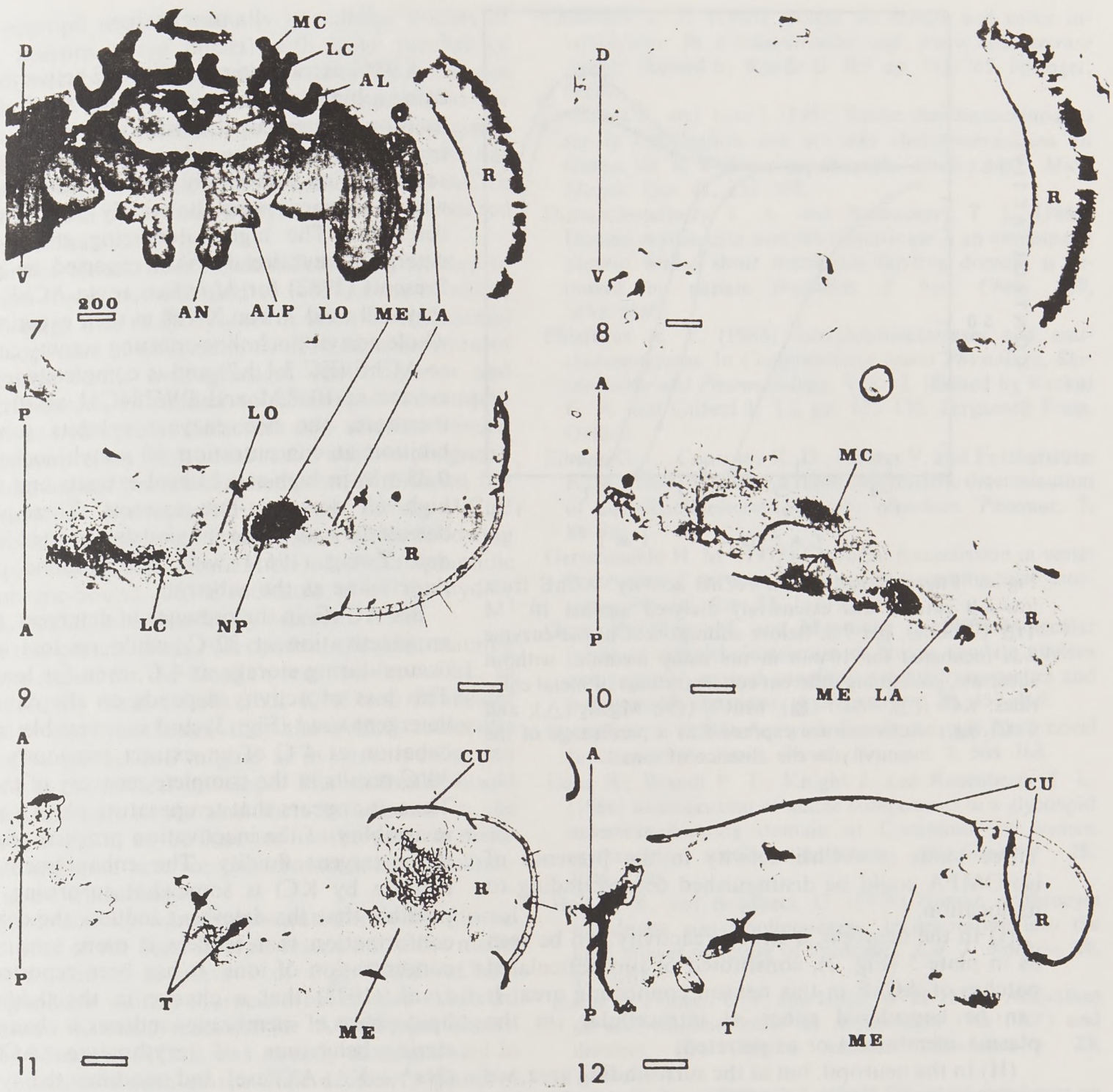


Fig. 7. Histochemical localization of bee head AChE. All sections were stained the Koelle's reaction except for plates 7 and 8 where the Karnovsky and Roots reaction was used (gift from J. P. Toutant, INRA Montpellier). All Koelle's reactions were post-stained with hemalun except for 1, 11 and 12 unstained. Scales were given in μm. AChE location (plates 1 to 6): all scales represented 200 μm unless otherwise indicated. Plates 1 and 3 showed the AChE mainly distributed in the neuropil appearing as a heavy black stain. Small dots of AChE were also distributed in the non-neuropil region of the brain but the retina, as shown in (1). Either incubated for 60 min (plate 2) or 20 min (plate 3), spots of AChE activity showed that the stain was localized in cell bodies in the vicinity of the neuropil. An enlargement of the optic lobe (plate 4) revealed that scarce dots of AChE were distributed in the neuropil region of the lamina after long term incubation. Plate 5 showed the strong neuropil reactivity to AChE of type I; Plate 6 revealed the type II AChE reactivity as dots in the peripheric area of the neuropil and type III AChE reactivity surrounding neuron nuclei (N) and glial cell nuclei (G). AChE specificity (plates 7 to 12): all scales represent 200 μm. The Karnovsky and Roots reaction for AChE was less discriminative as regarded to neuropil and cell bodies regions in this usual frontal section of the plate 7, except for the mushroom bodies heavily stained. With this technique patches of AChE reactivity were undistinguishable since the stain was uniform. There was no doubt about the specificity of the reaction since it was totally inhibited with eserine as in plate 8. The proof for Koelle's reaction specificity was given in the last 4 plates. The reactivity of AChE without inhibitor (plate 9) was quite identical, at the same incubation time (20 min), to the one (plate 10) in the presence of 10^{-5} M iso-OMPA, a compound inhibiting all pseudocholinesterases. This specificity was confirmed with 10^{-5} M BW284C51 (a specific inhibitor for true AChE) as in plate 11, and with 10^{-5} M eserine inhibiting all cholinesterases as in plate 12. In these last two plates (unstained with hemalun) the surrounding dark color was due to the brown color of the cuticle (CU) and the tentorum (T). Abbreviations: A = anterior; AChE = AChE stain, Al = alpha lobe; ALP = anterolateral protuberance; AN = antennal lobe (glomeruli of the antennal olfactory lobe); CU = cuticle; D = dorsal; DPC = dorsal protocerebral commissure; F = fat body; G = glial nucleus coated with AChE; LC = lateral calix (mushroom body); LA = lamina; LO = lobula; M = muscle of the posterior part of the head; M AChE = myotube exhibiting a positive AChE reactivity coating the central nuclei; MC = median calix (mushroom body); ME = medulla; NP = neuropil; R = retina; N = neuron with nucleus coated with AChE; P = posterior; PCT = protocerebral calycal tract; T = tentorium cuticle; V = ventral; I, II, III = three kinds of AChE reactivity in regard to its location to the neuropil.

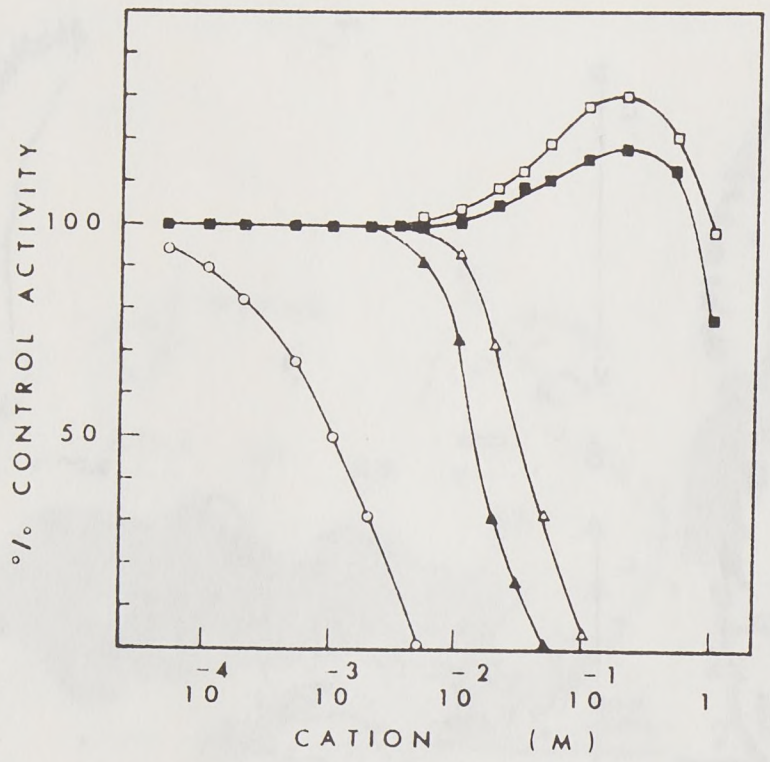


Fig. 6. Effect of cations on AChE activity. AChE from low-salt extract was extensively dialysed against 10^{-2} M Tris–Cl buffer, pH 7.2. Before adding AcSCh, the enzyme was incubated for 10 min in the assay medium, without substrate, containing different concentrations of metal chlorides: KCl (□); NaCl (■); $MnCl_2$ (○); $MgCl_2$ (△); and $CaCl_2$ (▲). Activities are expressed as a percentage of the activity in the absence of ions.

Three kinds of AChE activity in the presence of iso-OMPA could be distinguished corresponding to its location.

(I) In the neuropil, a strong reactivity can be seen as in plate 5 (Fig. 7), constituted of tiny reticulated patches of AChE in this neuron connecting area. It can be considered either as intracellular (in the plasma membrane) or as secreted.

(II) In the neuropil, but at the surrounding area, we can see bigger clumps of AChE activity in plate 4 as in plate 5 (Fig. 7). These clumps as seen in plate 6 (Fig. 7) after a short incubation time (20 min) and are built with small dots of AChE.

(III) Outside the neuropil, the AChE activity corresponds to the nucleus post-stained with hemalun. This AChE seems to coat the shape of the nucleus which is close to the neuropil as neurons (N) or as glial cells (G) with small nuclei. The AChE reactivity having the nucleus shape is restricted to the very close vicinity of the neuropil.

Shorter incubations revealed far less reactivity for AChE in the lamina of the protocerebron than in other region of the optic lobes (Fig. 7, plates 9 and 10) and at higher magnification (plate 4). The use of iso-OMPA, a specific inhibitor for pseudocholinesterase, confirms the identity of true AChE (Fig. 7, plates 9 and 10). Complete inhibition was performed with BW284C51 (Fig. 7, plate 11) as well as with eserine 10^{-5} M (Fig. 7, plate 12). No stain was achieved without AcSCh substrate.

Karnovsky and Root's technique is more sensitive and revealed a fast-staining activity for AChE in the neuropil but more fuzzy staining elsewhere in neuron and glial cells (Fig. 7, plate 7). Eserine inhibited the entire activity (Fig. 7, plate 8).

DISCUSSION

A 98% extraction rate of AChE activity is obtained using a high-salt buffer containing 1% Lubrol-PX, a non-ionic detergent. Lubrol-PX is not of a common use but it offers the advantage of a high level of solubilization and exhibits a low inactivating effect when compared with the widely used Triton X-100 detergent. The high solubilizing effect of Lubrol detergent has already been reported by Silver and Prescott (1982) for *Manduca sexta* AChE, although they still used Triton X-100 in their experiments. The whole acetylthiocholine-splitting activity corresponds to AChE (EC 3.1.1.7) and is completely inhibited by eserine at 10^{-6} M and BW284C51 at 10^{-5} M. Furthermore, the bee enzyme exhibits substrate inhibition at concentration of acetylthiocholine from 0.25 mM in high-salt Lubrol extracts and 0.3 mM in high-salt detergent-free extracts. These values are consistent with those previously reported by Kunkee and Zweig (1963) with acetylcholine or acetylthiocholine as the substrate.

Bee AChE, in the presence of detergent, undergoes an inactivation at 30°C, while no loss of activity occurs during storage at 4°C, even for long periods. This loss of activity depends on the nature of the detergent used (Fig. 3) and is reversible, since reincubation at 4°C of an extract previously stored at 30°C results in the complete recovery of the activity. Thus, it appears that temperature plays a role in the reversiblity of the inactivation process, probably via the detergent fluidity. The enhancement of inactivation by KCl is somewhat surprising, but it is possible that the detergent induces the enzyme to a conformation that renders it more sensitive to the concentration of ions. It has been reported by Bloj *et al.* (1973) that a change in the fluidity of the lipid phase of membranes induces a change in allosteric behaviour of erythrocyte AChE [and $(Na^+ + K^+)$-ATPase] and modifies the type of inhibition by the F^- ion, although AChE does not have the structural feature that enable some enzymes to bind fluoride (Wilson, 1985).

Bee AChE is susceptible to the presence of divalent cations Ca^{2+}, Mg^{2+} and Mn^{2+}. A concentration of 5 mM Mn^{2+} completely inhibits the AChE activity while about 50 and 100 mM are required for complete inhibition by Ca^{2+} and Mg^{2+}, respectively. At the concentrations used, no enhancement of the activity was found as shown in *M. sexta* with Mg^{2+} and Ca^{2+} (Lester and Gilbert, 1987), in *Electrophorus electricus* with Ca^{2+} (Hughes and Bennett, 1985), in electric rays with Mn^{2+}, Mg^{2+} and Ca^{2+} (Sakai *et al.*, 1985), and in *Torpedo marmorata* with Ca^{2+} and Mg^{2+} (Hofer *et al.*, 1984). On the other hand, the bee enzyme is activated by the monovalent cations Na^+ and K^+ with an optimal concentration of 0.2 M. A similar effect has been reported in *T. marmorata* (Hofer *et al.*, 1984) whereas an inhibition by Na^+ was observed in *E. electricus* (Hughes and Bennett, 1985). It is likely that such effects of monovalent ions are produced in relation to membrane potential regulation during nerve transmission, in which various ions may be involved (Gershenfeld, 1973).

The most interesting result, in the histochemical study, is the localization of AChE spots in the

non-neuropil region, specially in cellular bodies of both neurons (large nuclei) with large patches of AChE reaction, and glial cells (smaller nuclei). It can be assumed that this location superimposed to the nuclei is not artifactual, i.e. due to an unadjusted osmotic pressure blocking AChE activity in the nuclear envelope. It could also be assumed that AChE synthesized in the cellular body is momentarily stored in the nuclear envelope.

Further ultrastructural identification is needed to confirm this hypothesis and to localize the synthesis and storage sites in the cytosol in order to understand the biogenesis of this molecule. The identification of molecular forms with gradient centrifugation and electrophoresis is needed to determine the amphiphilic or hydrophilic molecules and whether dimeric forms are present (Belzunces *et al.*, work in progress). Immunological probes directed toward different hydrophilic or hydrophobic domains of the AChE molecules should be an invaluable tool for following the processing and localization of the amphiphilic membrane-bound AChE molecule or of the hydrophilic AChE molecule likely secreted.

In this present study, we confirm the faint staining lamina region for the Koelle's reaction for AChE, as observed by Kral (1984) and, Kral and Schneider (1981). We hypothesize that the AChE molecules could be synthesized in glial as in neuron cells, and stored in the nuclear envelope. The molecule should transit through axons and then be secreted in the neuropil region or be inserted in the plasma membrane and used here for the termination of cholinergic neuro-transmission.

AChE activity was demonstrated in a few dorsal myotubes of the head of *Apis* restricted to the nuclei area, as shown in plate 1 of Fig. 7 (M AChE). Longitudinal ventral thoracic muscles also exhibited the same Koelle's reaction for AChE (not shown here). Muscular AChE was already demonstrated in the muscular sheath of the male accessory gland of *Tenebrio* (Lenoir-Rousseaux and Gautron, 1987). This muscular AChE coating the nucleus was also revealed by the same technique with extrinsic leg muscles of *Drosophila melanogaster* (unpublished results) confirming the finding of non-neural AChE (Zador *et al.*, 1986). These findings are under investigation even with respect to the non-cholinergic functions of AChE as previously pointed out by Greenfield (1984).

Acknowledgements—We wish to thank Dr Patrick Masson and Professors Jacques Marvaldi and J. Gautron for discussion and critical reading of the manuscript. We are very grateful to René Paris, Alain Paris and Thierry Andrieu for competent bee-keeping, and to Jean Royère for the preparation of the manuscript.

REFERENCES

Bloj B., Morero R. D. and Farias R. N. (1973) Membrane fluidity, cholesterol and allosteric transitions of membrane-bound Mg^{2+}-ATPase, $(Na^+ + K^+)$-ATPase and acetylcholinesterase from rat erythrocytes. *FEBS Lett.* **39,** 101–105.

Bon S., Vigny M. and Massoulié J. (1979) Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **76,** 2546–2550.

Chadwick L. E. (1963) Action on insects and other invertebrates. In *Cholinesterases and Anti-Cholinesterase Agents.* (Edited by Koelle G. B.), pp. 741–765. Springer, Berlin.

Couteaux R. and Taxi J. (1952) Recherches histochimiques sur la distribution des activités cholinestérasiques au niveau de la synapse myoneurale. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.* **41,** 352–392.

Dutta-Choudhury T. A. and Rosenberry T. L. (1984) Human erythrocyte acetylcholinesterase is an amphipatic protein whose short membrane-binding domain is removed by papain digestion. *J. biol. Chem.* **259,** 5653–5660.

Eldefrawi A. T. (1985) Acetylcholinesterases and anticholinesterases. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 12, (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L. I.), pp. 115–130. Pergamon Press, Oxford.

Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. and Featherstone R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmac.* **7,** 88–95.

Gerschenfeld H. M. (1973) Chemical transmission in vertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiol. Rev.* **53,** 1–119.

Grassi J., Vigny M. and Massoulié J. (1982) Molecular forms of acetylcholinesterase in bovine caudate nucleus and superior cervical ganglion: solubility properties and hydrophobic character. *J. Neurochem.* **38,** 457–469.

Greenfield S. (1984) Acetylcholinesterase may have novel function in the brain. *Trends Neurosci.* **7,** 364–368.

Haas R., Brandt P. T., Knight J. and Rosenberry T. L. (1986) Identification of amine components in a glycolipid membrane-binding domain at C-terminus of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochemistry* **25,** 3098–3105.

Hall E. R. and Brodbeck U. (1978) Human erythrocyte membrane acetylcholinesterase. Incorporation into the lipid bilayer structure of liposomes. *Eur. J. Biochem.* **89,** 159–167.

Hofer P., Fringeli U. P. and Hopff W. H. (1984) Activation of acetylcholinesterase by monovalent (Na^+, K^+) and divalent (Ca^{2+}, Mg^{2+}) cations. *Biochemistry* **23,** 2730–3734.

Hughes R. J. and Bennett J. (1985) Effects of metal ions on the activity of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). *Biochem. Soc. Trans.* **13,** 219–220.

Karnovsky M. J. and Roots L. (1964) A direct-coloring thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* **12,** 219–222.

Koelle G. B. and Friedenwald J. S. (1949) An histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **70,** 617–622.

Kral K. (1984) Occurrence and distribution of acetylcholinesterase in the ocellar nerve tract of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Zool. Jb. Physiol.* **88,** 405–414.

Kral K. and Schneider L. (1981) Fine structural localisation of acetylcholinesterase activity in the compound eye of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Cell Tiss. Res.* **221,** 351–359.

Krysan J. L. and Kruckeberg W. C. (1970) The sedimentation properties of cholinesterase from mayfly (*Hexagenia bilineata* (Say); Ephemoptera) and the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Int. J. Biochem.* **1,** 241–247.

Kunkee R. E. and Zweig G. (1963) Substrate specificity studies on bee acetylcholinesterase purified by gradient centrifugation. *J. Insect. Physiol.* **9,** 495–507.

Lazar M. and Vigny M. (1980) Modulation of the distribution of acetylcholinesterase molecular forms in murine Neuroblastoma x Sympathetic ganglion cell hybrid cell line. *J. Neurochem.* **35,** 1067–1079.

Lenoir-Rousseaux J. J. and Gautron J. (1987) Activity, localization and molecular form of acetylcholinesterase in

the male accessory glands of metamorphosing *Tenebrio molitor* L. *Insect. Biochem.* **17**, 739–750.

Lester D. and Gilbert L. (1987) Characterization of acetylcholinesterase activity in the larval brain of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **17**, 99–109.

Low M. G. and Finean J. B. (1977) Non-lytic release of acetylcholinesterase from erythrocytes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *FEBS Lett.* **82**, 143–146.

Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193**, 265–275.

Massoulie J. and Bon S. (1982) The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *A. Rev. Neurosci.* **5**, 57–106.

Metcalf R. L. and March R. B. (1950) Properties of acetylcholine esterase from the bee, the fly and the mouse and their relation to insecticide action. *J. econ. Ent.* **43**, 670–677.

Mobbs P. G. (1985) Brain structure. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 5 (Edited by Kerkurt G. A. and Gilbert L. I.), pp. 299–370. Pergamon Press, Oxford.

Rosenberry T. L. (1985) Structural distinctions among acetylcholinesterase forms. In *Enzyme in Biological Membranes* in 2nd edn, Vol. 3 (Edited by Martonosi A. N.), pp. 403–429. Plenum Press, New York.

Sakai M., Saisu H., Koshigoe N. and Abe T. (1985) Detergent-soluble form of acetylcholinesterase in the electric organ of electric rays. Its isolation, characterization and monoclonal antibodies. *Eur. J. Biochem.* **148**, 197–207.

Silver L. H. and Prescott D. J. (1982) Aggregation properties of the acetylcholinesterase from the central nervous system of *Manduca sexta*. *J. Neurochem.* **38**, 1709–1718.

Smallman B. N. and Mansingh A. (1969) The cholinergic system in insect development. *A. Rev. Ent.* **14**, 387–408.

Taylor P., Schumacher M., MacPhee-Quigley K., Friedman T. H. and Taylor S. (1987) The structure of acetylcholinesterase: relationship to its function and cellular disposition. *Trends Neurosci.* **10**, 93–95.

Vigny M., Bon S., Massoulié J. and Gisiger V. (1979) The subunit structure of mammalian acetylcholinesterase: catalytic subunits, dissociating effect of proteolysis and disulfide reduction of the polymeric forms. *J. Neurochem.* **33**, 559–565.

Wilson I. B. (1985) Cholinesterase: two surprising inhibitors. In *Molecular Basis of Nerve Activity* (Edited by Changeux J. P.), pp. 667–678. de Gruyter, Berlin.

Zador E., Gausz J. and Maroy P. (1986) Tissue-specific expression of the acetylcholinesterase gene in *Drosophila melanogaster* embryos. *Molec. gen. Genet.* **204**, 469–472.

b) Le mécanisme associatif des α-glucosidases de l'abeille.

La relation entre l'associativité moléculaire dirigée par le substrat et la coopérativité apparente finale du complexe enzymatique apparaît avec de plus en plus de certitude. Le modèle moléculaire fait l'objet d'une étude de confrontation des prédictions théoriques et des vérifications expérimentales qui se poursuivra avec intensité en 1989 et devrait permettre de déduire, d'une part, l'équation générale du mécanisme et, d'autre part (à terme) l'équation donnant la relation théorique entre le coefficient de Hill et les concentrations en glucose.

Au stade actuel, l'équation obtenue permet de prévoir également une ralation entre le coefficient de Hill et les concentrations en substrat, ce que l'expérimentation permettra de vérifier, grâce aux méthodes de calcul de V_M les plus performantes, récemment mises au point (voir toxicologie théorique).

Un échange de correspondance a été noué avec le Professeur Tamas KELETI, à l'Institut d'Enzymologie de l'Académie des Sciences de Hongrie, Haut-lieu mondial de l'enzymologie théorique.

Glycosidase specificity and apparent cooperativity as related to substrate-directed aggregation of enzyme asymmetric protomers

M. BOUNIAS

Laboratory of Biochemistry, INRA and
University of AVIGNON, B.P. 91, F-84140 Montfavet (France)

ABSTRACT. - Based on experimentally determined glycosidase molecular forms and their specificity and apparent Hill coefficients against trehalose (1.4) and sucrose (0.6) in honeybees haemolymph, a theoretical model is designed, involving differential types of aggregation of a single enzyme protomer. This basic unit would contain one trehalose specific site and two asymmetrical subsites : one would contain a catalytic zone and both share an affinity for any substrate (not-specific binding zone). Then, the predicted aggregation possibilities of the protomer into dimers, trimers and tetramers, very closely accounts for all the experimentally determined properties of the enzymes. Moreover, the hypothesis that the enzyme aggregation may be directed by the particular substrate present in major concentrations in the medium is supported by the observed differences in enzyme polymorphism following pre-incubation in presence of high concentrations of either trehalose or sucrose in the medium.

Running title : substrate-directed properties of enzymes.

INTRODUCTION

The fact that the presence of a given substrate inside a cell may induce the synthesis of an adapted enzyme molecule is indeed one of the most striking biochemical features of life regulation processes. This kind of mechanism is daily involved, for instance, in the induction of our digestive enzymes by ingested foods (1). The way through which increased amounts of enzyme proteins are synthetized via gene activation is now rather well known (2). However, this kind of mechanism does not involve a direct information transfer between the substrate and the enzyme. By contrast, recent experiments on the induction of glycosidase activities by feeding honeybees with either trehalose or sucrose as the only source of nourishment suggested that in the early phase sucrase molecules could not only constitute a part of the trehalase complex already present, (3), but also result from a further modification of the specificity of an induced trehalase which would thus cope with the not natural substrate sucrose (4).

The aim of this work is therefore to propose a possible molecular mechanism accounting for the modification of enzyme structures according to the nature of the substrate present in the medium, with respect to some available experimental data.

MATERIAL AND EXPERIMENTAL METHODS

The initial trehalase complex was extracted form honeybees haemolymph, by puncturing the dorsal aorta. For these experiments, wintering bees were used.

The haemolymph glycosidases were separated by not denaturing 7.5 % polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), in 0.1 M pH 8.5 Tris-glycine buffer. The applied electric potential was 80 V for 50 mn followed by 160 V for 30 mn. Trehalase activities were recorded from 2 mm slices incubated for 2 hrs with 150 µl of 16 mM trehalose in phosphate buffer pH 6.8. Electrophoresis were performed from extracts respectively pre-incubated for 10 min in 1M trehalose or sucrose. During this incubation time, samples were exposed twice for 2 min 30 to mild ultra-sound treatment, in a 150 W cleaning tank, in order to facilitate the molecular rearrangements.

Statistical comparisons of means and estimation of the significance of correlation coefficients were performed using the student's "t" distribution.

MOLECULAR MODEL AND RESULTS

1 - Enzyme configuration.

Let us consider a low molecular weight enzyme, fitted for trehalose binding and hydrolysis into two molecules of glucose.

The active site consists of two particular zones : one, the substrate site, allows the more or less specific recognition and binding of substrates, and the other, the catalytic site, contains the appropriate radicals which actually enhance the reaction (7). In the case of glycosidases, i.e. hydrolases (E.C. 3-2-1), the catalytic site should contain an histidine and a serine or aspartic acid radical (8), and the substrate site should be fitted to the common molecular configuration of all possible substrates (fig. 1A). Here, trehalose (an $\alpha\alpha$'diglucoside) and sucrose (a glucose $\alpha(1\rightarrow2)$ fructoside) exhibit the α-glucose moiety as a common part. However, the other moiety is quite different, the fructoside looking of more angular shape than the glucoside (fig. 1B), and it is likely that specific trehalose sites cannot bind sucrose, whereas sucrose sites are less specific and can accept the binding of trehalose as well as other substrates such as the artificial para Nitro Phenyl α-D Glucoside (9). This hypothesis is strengthened by the fact that of the various trehalase molecular forms, only a small number are active against sucrose and pNP α-D Glucoside (9).

Let us now consider a liquid medium in which the substrate is present together with the enzyme. The affinity between the substrate molecule and the subsites of the enzyme as a protomer will result in the aggregation of the protomer into aggregates of increasing apparent molecular weights.

Depending on whether a catalytic site is present or not in appropriate position relatively to the substrate, the complex will exhibit, or not, an additional enzymic activity (fig. 2). The three possible dimers obtained allow the binding of one sucrose molecule and either three trehalose ones, or between one and two, in the case of a mixture of trehalose and sucrose : in effect, according to the vicinity of the sites, it might happen that the binding

of a sucrose molecule prevent more or less completely the binding of the second trehalose one. Reciprocally, the binding of two trehalose molecules on the dimer might prevent the binding of a sucrose one, but not of a third trehalose molecule.

Fig. 3 shows the 4 different possible configurations of a trimer. The tetramer configurations allows 10 different molecular forms which have not been represented here.

It should be pointed out that after a substrate molecule has gathered two enzyme moieties, the resulting complex may remain stable after the substrate has been either dissociated from the complex or splitted into products, because of the mutual affinity of the substrate-binding zones of the paired subsites.

2 - Predicted against observed substrate VS enzyme stoichiometry.

The ratio of the number of bound substrate molecules to the number of involved enzyme units has been independently interpreted in terms of apparent cooperativity in 1983 by Kurganov (5) and by Bounias (6). This ratio has been shown to be consistent with the Hill coefficient in the case of honeybees α-glucosidases (6).

Here, ignoring the cases of steric competition of substrate molecules binding vicinal sites, these ratio would reach the minimum values indicated in table 1. The data indicate an apparent positive cooperativity for trehalose and a negative one for sucrose.

Now, from the experimental study of specific sucrase and trehalase activities (8), the following Hill coefficients were recorded :

Trehalase	$n = 1.41 \pm 0.08$	(N=7)
Sucrase	$n = 0.63 \pm 0.06$	(n=4)

These data are well consistent with those predicted for trehalose, but higher than those predicted for sucrose, which indicate a higher stability of some of the complexes which allow the largest number of sucrose molecule to bind the subsites. This is the case, in particular, if all enzyme subunits link to one another in the same way, giving a sucrose-compatible subsite. This

configuration leads to the highest possible binding capacities for sucrose, and the resulting cooperativity coefficients will then depend on the relative proportions of the various complexes present in the medium : table 2 indicates the expected theoretical coefficients and the average proportions of the various complexes, as estimated from a series of previous experiments (10).

Then, the weighted average values for the expected Hill coefficients would be the following :

Trehalase	$n = 1.46 \pm 0.04$	(n=4)
Sucrase	$n = 0.634 \pm 0.05$	(n=4)

These data are very close and not at all statistically different (at P=0.68 and P=0.74, resp.) from those experimentally obtained.

3 - Influence of the substrate structure on the mode of aggregation of enzyme subunits.

Between the previous extreme cases, it can be expected that the presence of high concentrations of one of the two considered substrates, would favour the complex structures the best fitted to this substrates. This means that high sucrose concentrations would favour the molecular arrangements corresponding to the greatest numbers of sucrose subsites, and reciprocally for trehalose.

Fig. 4 illustrates the results obtained using an haemolymph sample extracted from wintering adult honeybees.

This stage was choosen for minimum trehalosemia (5 ± 2 mM, N=5) by contrast with emerging and foraging adults (30 ± 15 mM, N=44).

The initial pattern (Po) contains four major fractions, A, B, C and E, fraction C being composed of at least two subfractions (not separated in the present experiments).

Incubating a first aliquot of this sample with 1 M trehalose elicits a new pattern (P_1, in which fraction E is increased and

fractions D, not present in Po, appears.

Then, incubating a second aliquot with 1M sucrose gives a third pattern P_2, in which fraction D is increased and likely divided into D_1 and D_2, and fractions B and C depressed.

The statistical comparison of these three patterns using the correlation calculation between the quantitative contribution of each pairs of homologous fractions gave the data indicated in table 3.

There is, accordingly, no significant difference between the initial and trehalose enriched extracts, whereas sucrose incubation results in a significant deviation from both others.

DISCUSSION

The fitness of the experimental data to the proposed model lies on 4 major points.

a) The model explains very well the positive or negative apparent cooperativity respectively observed when trehalose or sucrose are used as substrates. The quantitative values are in favour of a better stability of the sucrose-adapted complexes.

b) The proposed model suggests that several types of aggregates could be simultaneously present, with similar cooperativity coefficients: this is the case for dimers (D_1 and D_3) for trimers (T_1 ; T_2) and for three out of the ten possible tetramers, all exhibiting, in their category, the higher levels of cooperativity. This is consistent with previous experimental data exhibiting up to 7 distinct fractions.

A rough estimation of their possible molecular weights (11) allowed fraction E to be considered as a protomer (MW $\simeq$ 80-100 K), and fraction D, C_2 ; C_3 as various forms of dimers ($\simeq$ 140-190 K). Then, fractions C_1 to B could be trimers (MW $\simeq$ 230-280 K) and fraction A would gather the tetramers (MW. $\simeq$ 350-420 K, not separated.

c) The model indicates that lower size complexes, i.e. dimers and of course the monomers, will exhibit the lower activity against sucrose, by contrast with a high capacity of splitting trehalose: this is consistent with the obtained experimental data concerning the specificity of the enzyme fractions against trehalose or sucrose (10).

d) A differential aggregation of the enzyme protomers into various complexes fitted to the substrate present in the medium is predicted by the model and verified through experiments involving a preliminary incubation in high concentrations of each substrate, and the detection of enzyme activities using the most universal substrate, i.e. trehalose.

Even if this set of arguments is not yet strong enough to let us believe that the proposed model actually represents the reality

of honeybees haemolymph α-glucosidase complexes, it may however be expected that the adequacy of the predicted and observed properties of the system reveals at least a part of truth.

In practice, a competition very likely occurs between sucrose added as a linking factor, and trehalose molecules already present in the haemolymph of bees. But the ratio is about 100 against 1 in favour of the sucrose influence, so that a significant specific effect could actually be expected.

How a complex initially fitted for trehalose can be partly dissociated prior to rearrangement by sucrose might be explained by the suggestion that in a linearly associating system, the high concentrations of specific ligand provokes the dissociation of the complexes because of the occupation of both subsites (12). The results shown on fig. 4 confirm that increasing trehalose concentrations or adding an excess of sucrose actually decreases the amount of higher complexes (forms A and B). However, the lower form (D) which appears in the same time should be stable and active in presence of high substrate levels. The dissociation of complexes at high ligand concentrations might therefore be limited to some of the complexes which exhibit a maximum aggregation degree. These consideration can now be converted in terms of dissociation constants. Let EE_1, EE_2, EE_3 be the three dimeric forms (fig. 2) : their aggregation results from : 1) spontaneous effect ; 2) trehalose action ; 3) sucrose action. The dissociation constants for aggregation reactions (^{A}K) are :

$^{AE}K_i$ for $E + E \rightleftharpoons EE_i$ |1| |1|

$^{AT}K_i$ for $E + E + T \rightleftharpoons EE_i\,(T)| \rightleftharpoons EE_i + T|$ |2|

$^{AS}K_i$ for $E + E + S \rightleftharpoons EE_i\,(S)| \rightleftharpoons EE_i + S|$ |3| |3|

Then, according to the chirality of the protomers, the 3 dimers exhibit the following catalytic constants (^{c}K) at the molecular junction:

$EE_1 + T \rightleftharpoons EE_1\,T \rightleftharpoons P \quad (^{c}K_{T_1})$ |4|

$EE_1 + S \longrightarrow$ no binding |5| |5|

$$EE_2 + T \rightleftharpoons EE_2(T) \rightarrow \text{no reaction } ({}^{c}K_{T2}) \quad |6|$$

$$EE_2 + S \rightleftharpoons EE_2(S) \rightarrow \text{no reaction } ({}^{c}K_{S_2}) \quad |7|$$

$$EE_3 + S \rightleftharpoons EE_3\,S \rightleftharpoons P \quad ({}^{c}K_{S_3}) \quad |8|$$

$$EE_3 + T \rightleftharpoons EE_3\,T \rightleftharpoons P \quad ({}^{c}K_{T_3}) \quad |9|$$

|9|

These reactions could occur in addition to the normal ones, allowed by each protomer, which would be specific for trehalose:

$$E + T \rightleftharpoons (ET) \rightleftharpoons P \quad ({}^{c}K_{To}) \quad |10|$$

With respect to the available experimental data and to the model conformation, the following conditions can be suggested :

$${}^{AE}K_i < {}^{AT}K_i \gtrless {}^{AS}K_i \quad |11|$$

$${}^{AT}K_3 \gtrless {}^{AS}K_3 < {}^{AT}K_2 \quad |12|$$

$${}^{c}K_{T_3} \gtrless {}^{c}K_{S_3} < {}^{c}K_{T_1} \gtrless {}^{c}K_{To} \quad |13|$$

$${}^{c}K_{T_2} \gtrless {}^{c}K_{S_2} < {}^{AT}K_2 \gtrless {}^{AS}K_2 \quad |14|$$

Equations |2| and |3| should, in fact, be subdivided into several intermediates involving a first binding of T or S to one or the other side of E :

$$T + E \rightleftharpoons TE \qquad (K_{TE}) \quad |15|$$

$$T + E \rightleftharpoons E(T) \qquad (K_{E(T)}) \quad |16|$$

then the binding of a second protomer to these elementary complexes:

$$TE + E \rightleftharpoons (T)EE \qquad (K_{(T)EE}) \quad |17|$$

$$E(T) + E \rightleftharpoons EE(T) \qquad (K_{EE(T)}) \quad |18|$$

with ${}^{AT}K = K_{TE} \cdot K_{TEE} = K_{E(T)} \cdot K_{EE(T)}$ |19|

This system should then be extended to the formation of trimers and tetramers, whose stability partly depends on the additional condition that :

$$K_{TE},\ K_{E(T)} > K_{(T)EE},\ K_{EE(T)} > {}^{AE}K \qquad |20|$$

The full develcpment of this model, which is matter of work in progress, should give a generalization of the concept of cooperativity extended to cases involving a reversible molecular association of receptor protomers.

Now, this "moulding theory" of the substrate-directed enzyme conformation, might apply to numerous other cases, where structures are fitted to others. One striking example is given by antibodies, which are determined by the structure of antigens introduced in the organism : recent data (13) indicate that catalytic (i.e. enzyme) properties have been found for some antibodies. Another one concerns RNA, which is the archetype of a replicative structure. Transfer RNA (tRNA) are well known for their "clover leaf shape", which reflects the moulding of a part of the molecule on itself.

It is now known that tRNA molecules are able to play the part of enzymes against themselves (14) : this is an extreme case of internal adaptation of substrate and enzyme, both belonging to the same molecule.

It can be expected that, from the first stages of the building of Life, numerous processes have evolved from adaptative mechanisms based on the fitting of molecules to other molecules. The model proposed here might therefore reflect one of the last steps of a more general feature shared by numerous other biological functions involving ligands and receptors, and provide some additional basis for an extended concept of cooperativity.

Acknowledgements - Thanks are due to Mrs. N. BARESTE for expert typing of the manuscript and to Miss S. COULOMB for technical assistance.

REFERENCES

(1) DESNUELLE, P., Quelques exemples d'adaptation enzymatique chez les mammifères, Rev. Fr. Et. Clin. et Biol., 8, 494-506(1963).

(2) DANCHIN, A. and ULLMANN, A., The coordinate expression of polycistron operations in bacteria, Trends Biochem. Sci., 5, 51-52(1980).

(3) BOUNIAS, M. and MORGAN, M.R.J., Induction of honeybee haemolymph sucrase activity by high levels of dietary sucrose, Comp. Biochem. Physiol., 79B, 75-80(1984).

(4) BOUNIAS, M. and MORGAN, M.R.J., Haemolymph levels of carbohydrates and sucrase activity in honeybees fed on trehalose, IRCS Med. Sci. : Biochemistry, 12, 769-770(1984).

(5) KURGANOV, B.I., Specific Ligand-induced association of an enzyme. A new model of dissociating allosteric enzyme, J. Theor. Biol., 103, 227-245(1983).

(6) BOUNIAS, M., Une interprétation stoechiométrique de la signification du coefficient de Hill de certaines enzymes de cinétiques coopératives, C.R. Acad. Sci. (Paris), 297III, 583-588 (1983).

(7) DEFAYE, J., DRIGUEZ, H., HENRISSAT, B. and BAR-GUILLOUX, E., Etude de la specificité et du mécanisme d'action des tréhalases par utilisation d'analogues de substrat, Nouveau Journal de Chimie, 4, 59-68(1980).

(8) PALMER, T., in "Understanding Enzyme", second Edition, Ellis Horwood Ltd (1985).

(9) BOUNIAS, M. and MORGAN, M.R.J., Adaptation of honeybee haemolymph α-glucosidase to changing physiological requirements by transitions in the Hill coefficient, Int. J. Biochem., 16, 939-941(1984).

(10) BOUNIAS, M. and MORGAN, M.R.J., Formes moléculaires comparées des tréhalases, saccharases et α-D-glucosidases de l'hémolymphe d'Abeilles, C.R. Soc. Biol., 178, 29-37(1984).

(11) BOUNIAS, M. and MORGAN, M.R.J., Action du chloramphénicol sur l'évolution du spectre protéique de l'hémolymphe d'abeilles nourries sur sirops de saccharose et de tréhalose, Apidologie, 13, 115-126(1982).

(12) KURGANOV, B.I., Binding of specific ligand by linearly associating enzyme system, J. Theor. Biol., 109, 59-70(1984).

(13) LERNER, R.A. and TRAMONTANO, A., Antibodies as enzymes, Trends in Biochem. Sci., 12, 427-430(1987).

(14) CECH, T.R. and BASS, B.L., Biological catalysis by RNA, Ann. Rev. Biochem., 55, 599-629(1986).

Table 1 - Apparent cooperativity coefficients expected from the various possible cases of molecular aggregation of enzyme subunits, with either trehalose or sucrose as substrates

Configuration	forms number	Trehalose	Sucrose
monomer	1	1	0
dimers	3	1.33	0.33
trimers	4	1.50	0.50
tetramers	10	1.55	0.55
average :			
not weighted :	N=4	1.345	0.345
weighted :	N=18	1.47	0.47

Table 2 - Theoretical apparent Hill coefficients (n) for trehalase and sucrase molecular forms, and their expected proportions, as experimentally determined (means ± S.D. from N=4).

putative forms	Trehalases		Sucrases	
	(n)	average proportions	(n)	average proportions
monomer	1.00	0.20 ± 0.07	0.00	0.02 ± 0.04
dimer	1.50	0.44 ± 0.13	0.50	0.25 ± 0.19
trimer	1.66	0.20 ± 0.06	0.66	0.34 ± 0.13
tetramer	1.75	0.15 ± 0.04	0.75	0.38 ± 0.12

Table 3 - Comparison of the trehalase patterns obtained from haemolymph extracts without treatment (Po), or after incubation with 1M trehalose (P1) or sucrose (P2).

Comparisons :	P1 against Po	P2 against Po	P2 against P1
Correlation (ρ)	0.563	- 0.127	0.377
N	15	15	19
freedom degrees	13	13	17
$t = (\frac{\nu \cdot \rho^2}{1-\rho^2})^{\frac{1}{2}}$	2.46	0.46	1.67
P (ρ)	0.029	0.65	0.11

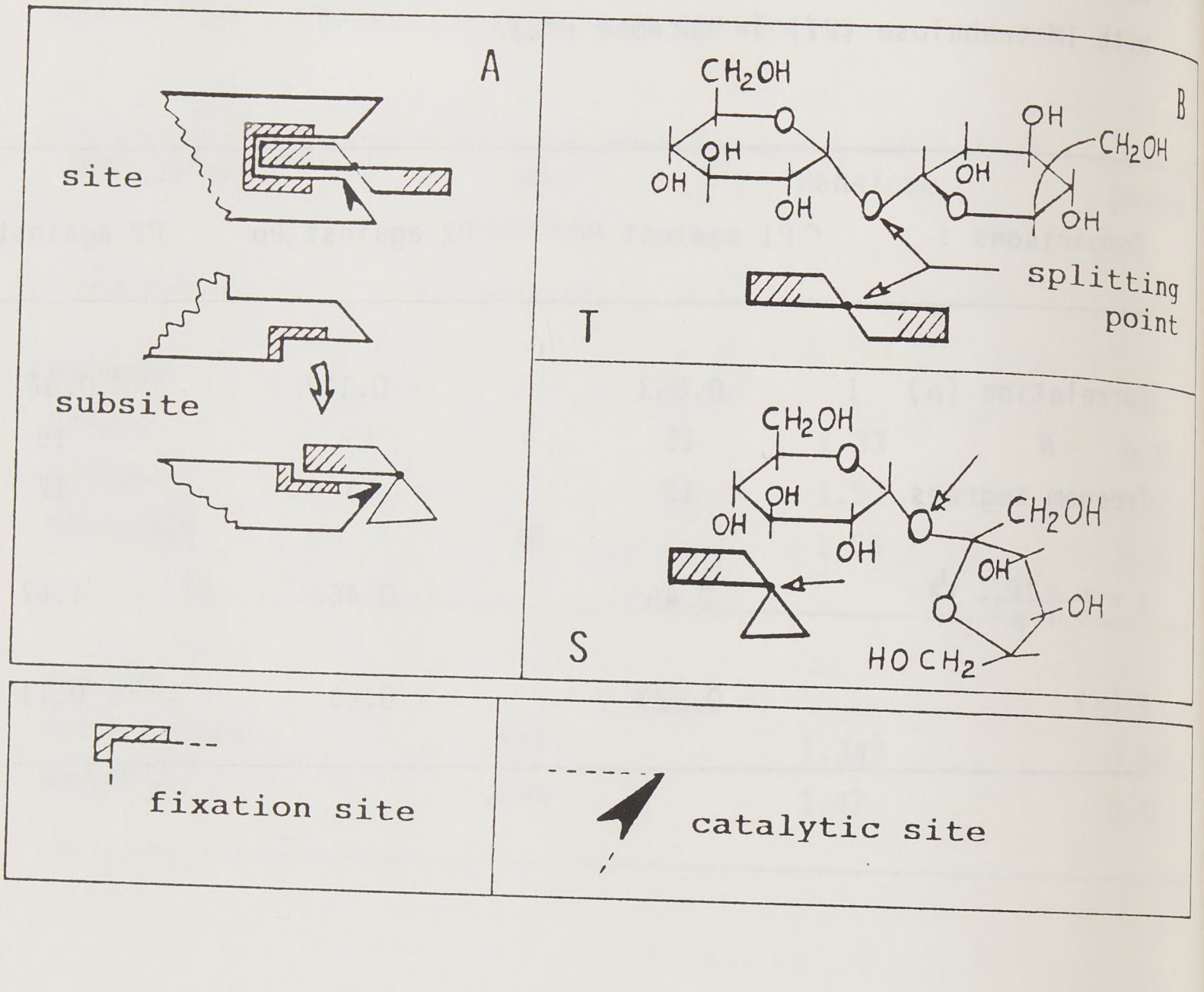


Fig. 1 - A - Schematic representation of enzyme full sites and subsites with appropriate substrates in reactive position. B - Symbolic configuration of trehalose (Tre) and sucrose (Suc) with respect to their simplified molecular structure.

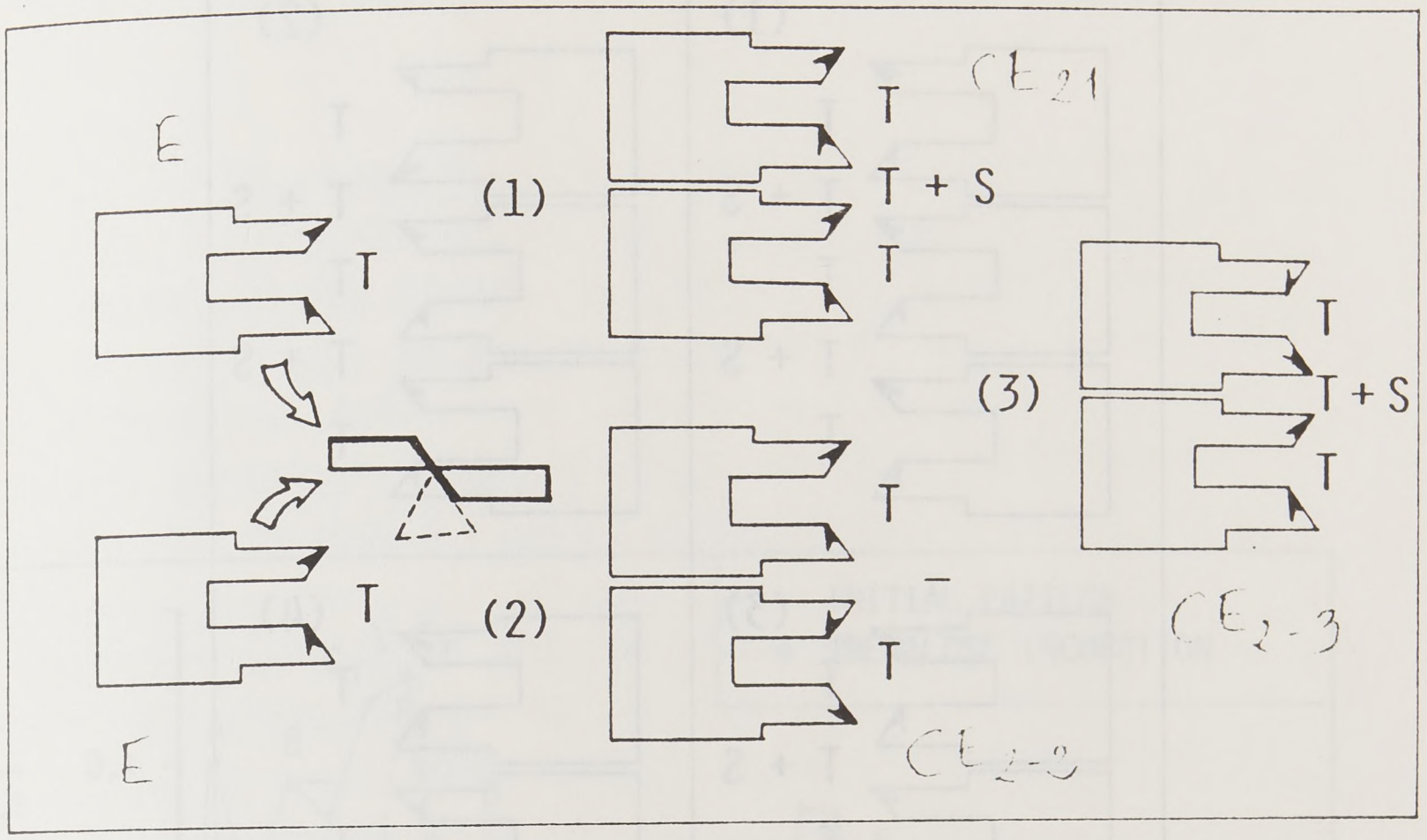


Fig. 2 - Different configurations of dimers produced under the aggregative action of trehalose (T) or sucrose (S). The substrates adapted to the preexisting or newly formed sites are indicated in front of each.

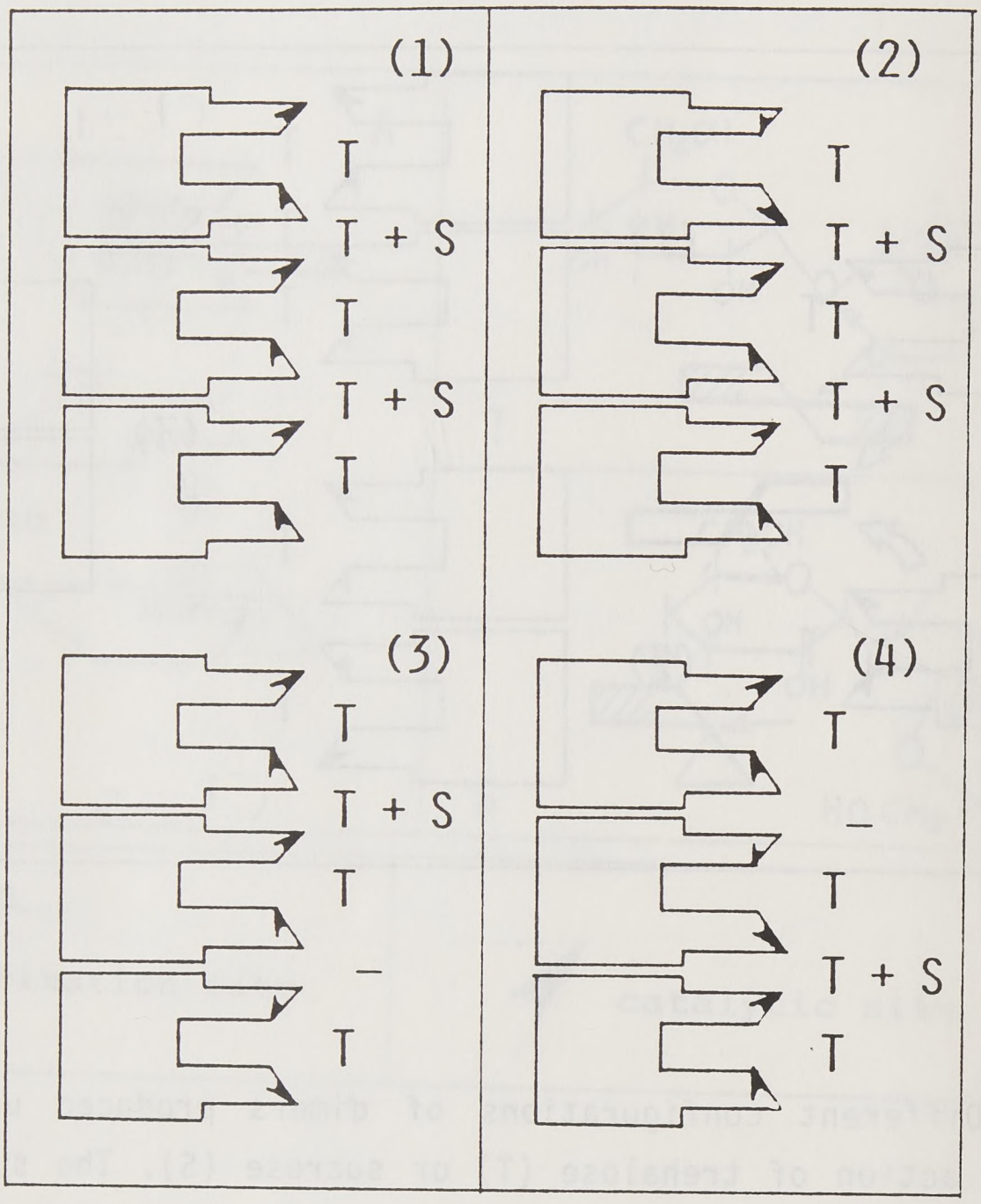


Fig. 3 - Different configurations of trimers produced under the aggregative action of trehalose (T) or sucrose (S). The substrates adapted to the preexisting or newly formed sites are indicated in front of each.

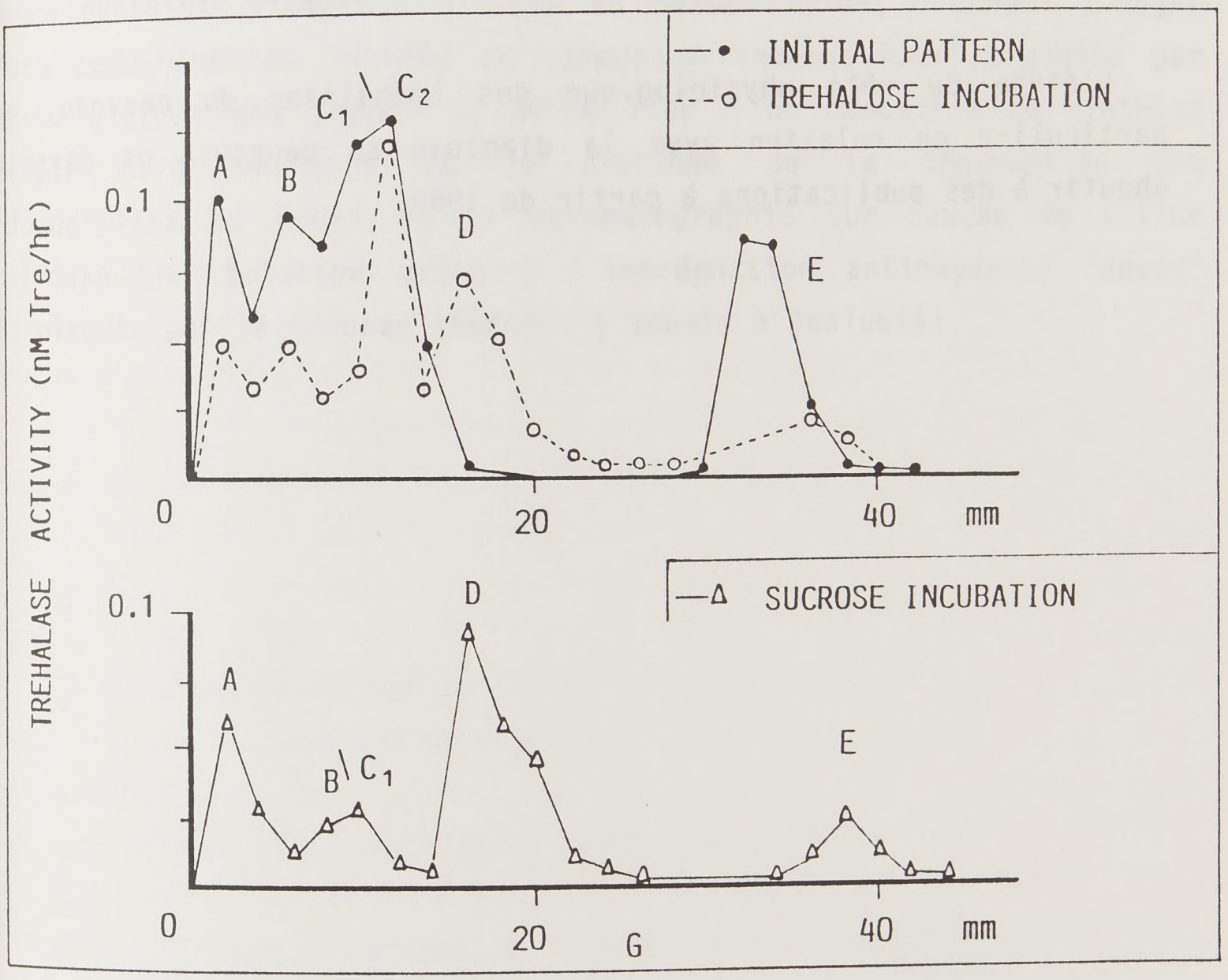


Fig. 4 - Patterns of trehalase forms separated by PAGE, in honeybees haemolymph without treatment or following incubation in trehalose or sucrose.

c) Interactions regulatrices entre enzymes et hormones.

Collaboration avec l'Université de Bordeaux (Prof. Dutrieu, Dr. Moreau).

L'expérimentation relative à l'analyse de l'activation moléculaire directe de la tréhalase de ténébrio par l'insuline endogène d'insecte se poursuit et devrait aboutir courant 1989. Il s'agira alors, de tenter de mettre en application les bases théoriques établies au cours des années précédentes pour l'interprétation cinétique d'un phénomène extrêmement nouveau et rarement observé. (1 publication prévue à l'issue du travail).

L'étude du rôle physiologique des tréhalases du cerveau, en particulier en relation avec la diapause se poursuit et devrait aboutir à des publications à partir de 1989.

II - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

La nécessité de développer l'analyse biochimique de la réponse des végétaux, en relation avec l'attaque de parasites et de pathogènes, nous a amenés à améliorer les techniques de séparation et de dosage des dérivés phénoliques et chlorophylliens.

Les nouvelles possibilités offertes par la spectrophoto-densitométrie directe en phase solide, ont fait l'objet d'une communication invitée au symposium international organisé par Merck. L'étude des phénols a donné lieu à un manuscrit de synthèse accepté dans Analusis et le problème de la dégradation des chlorophylles au cours de la chromatographie sur couche de silice a trouvé une solution grâce à l'imprégnation antioxydante "douce" des plaques par le glucose (manuscrit soumis à Analusis).

Coll. de CCM "Merck", Paris, Oct. 1988.

Développements de la spectrophotométrie en phase solide sur chromatogrammes en couche mince.

par M. BOUNIAS, Mme M.H. DAURADE
et Y. LIZZI*
Laboratoire de Biochimie - INRA-AVIGNON, B.P. 91
F84140 Montfavet (France)
*Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétales,
Université d'Avignon, 33, rue Pasteur, 84000 Avignon.

Résumé. - Les progrès réalisés dans la détection quantitative, sur l'ensemble du Spectre UV-visible, des substances séparées par chromatographie sur couches minces préfabriquées de gel de silice (Merck 5748) ont permis de substantielles améliorations dans les domaines d'analyse suivants :

1 - Les pigments photosynthétiques (sur plaques imprégnées ou non d'anti-oxydants).

2 - Les acides carboxyliques révélés par indicateurs de pH.

3 - Les phénols végétaux analysés directement dans l'Ultra Violet (avec comparaison des spectres obtenus respectivement en phase solide et en phase liquide).

4 - Les glucides révélés différentiellement au moyen du Naphtyl-éthylène-diamine-dichlorhydrate.

Developments of Solid-Phase Spectrophotometry on Thin Layer Chromatograms

Summary. - Recent advances in quantitative detection over the whole UV-visible spectrum, of compounds separated by TLC on silicagel precoated sheets (Merck 5748) allowed substantial improvements in the following analytical areas :

1 - Photosynthetic pigments (on sheets impregnated or not with antioxydants).

2 - Carboxylic acids visualized by pH indicators.

3 - Plant phenols directly analyzed in Ultra Violet (with comparison of the spectra respectively obtained in solid and liquid phases).

4 - Carbohydrates with differential revelation with Naphtyl-ethylene-diamine-dichloride.

INTRODUCTION

Au cours des années 1965 l'apparition sur le marché des premières plaques chromatographiques préparées industriellement, avec leurs couches de silice, d'alumine, de polycarbonate, etc ... pré-étalées sur supports plastiques souples, donnait un nouvel essor à la CCM, dont les possibilités restaient, souvent, encore potentielles plus qu'opérationnelles.

De nouvelles gammes de densitomètres (en fait, les premières véritablement diffusées en grandes séries) étaient prêtes, parallèlement, à conférer de manière décisive à la CCM le statut de technique quantitative.

Pour choisir les longueurs d'ondes les mieux appropriées à chaque objectif, il fallait alors explorer les réponses successives de la gamme des filtres disponibles, au prix de laborieuses séries d'enregistrements successifs des mêmes taches. Mais le résultat (fig. 1) n'en évoquait pas moins l'idée d'une certaine forme de spectres (1). Les possibilités de travail n'allaient guère au delà de 320-340 nm en UV., ni de 620 nm vers le rouge. Pourtant, malgré ces conditions très artisanales, le profil d'absorbance des chlorophylles sur couche mince (fig. 2A) n'était pas sans ressemblance avec leur spectre mesuré en phase liquide (fig. 2B)(1). Entre l'idée et la réalisation courante, il aura fallu une bonne quinzaine d'années, encore, pour qu'apparaissent les nouvelles générations de densitomètres équipés de monochromateurs, et que naisse véritablement la spectrophotométrie en phase solide, ou spectrodensitométrie.

Parmi les phases solides, la silice reste la plus employée, quoique les nouvelles phases inverses soient appelées à en prendre progressivement la relève. Il paraissait donc utile de lui consacrer les exemples qui suivent, et dont le premier représente le stade le plus récent de l'avancement des études relatives à l'analyse des pigments chlorophylliens.

I - Les Pigments Photosynthétiques : remèdes aux artefacts par oxydations et ...anti-oxydants.

La couche de silice se prête particulièrement bien à l'analyse des pigments photosynthétiques (2). Toutefois, les molécules de chlorophylles, et particulièrement la chlorophylle a, présentent une fragilité que peuvent accroître l'état physiologique de la plante aussi bien que les conditions d'extraction et de conservation des pigments. Dans ce cas, la silice favorise leur oxydation en une succession de dérivés : a', a", b', au cours de la migration. Il en résulte une succession de taches plus ou moins reliées par des traînées (fig. 3 A-B). L'imprégnation préalable des plaques par le thiosulfate ($Na_2S_2O_3$) ou le dithionite ($Na_2S_2O_4$), permet de résoudre ce problème en réduisant les diverses formes dérivées à leur état initial (fig. 3 C). Le spectre en phase solide imprégnée de $Na_2S_2O_3$ reste conforme à celui qui caractérise la molécule restée intacte sur plaque non traitée (fig. 4 A et D).

L'inconvénient de ce traitement, réside dans le fait que le β carotène est rapidement décoloré et ne peut donc plus être dosé directement.

Une solution intermédiaire a donc été proposée : elle consiste à imprégner les plaques d'un agent réducteur plus doux, en l'occurrence un sucre tel que le glucose : celui-ci présente, à la concentration de 125 mM, une efficacité réductrice satisfaisante (fig. 3 D) qui préserve également le spectre de la molécule (fig. 4 B)(3).

Dans ces conditions, la coloration du β carotène est préservée et son spectre présente un aspect tout à fait normal (fig. 5).

II - Les Acides carboxyliques : renouveau des indicateurs de pH comme réactifs quantitatifs.

Lors de récentes recherches sur deux diacides gras à courtes chaînes, identifiés comme hormones de survie de l'abeille (4), les difficultés d'analyse de ces composés ont justifié le recours aux indicateurs de pH comme réactifs de révélation post-CCM.

Les spectres comparés des zones basiques et acides, après révélation au vert de bromocrésol (fig. 5-1 et 2) montrent qu'une différenciation est possible sous réserve d'effectuer les enregistrements aux longueurs d'ondes caractéristiques, soit 430-440 nm pour les zones acides et 615-624 nm pour les zones basiques. Le caractère de chaque produit détermine ensuite un spectre plus ou moins déplacé vers l'une de ces deux longueurs d'ondes (fig. 5-3 et 4), ce qui permet d'obtenir des enregistrements respectifs avec absorbance positive ou négative (fig. 6)(5).

III - Les Phénols Végétaux : analyse directe en ultra violets, sans révélation chimique.

La révélation chimique des phénols végétaux, pour être suffisamment universelle exige 3 pulvérisations successives de réactif à la para nitraniline diazotée (5)(6). Les colorations obtenues sont parfois très faibles (ac. para coumarique, ac. cinnamique) et généralement instables, donc peu favorables à l'analyse quantitative.

Nous avons donc entrepris de dresser un atlas des propriétés chromatographiques et spectrales des composés phénoliques naturels par analyse directe dans l'Ultra-Violet, en phase solide (sans révélation chimique).

Tous les dérivés de l'acide trans cinnamique ainsi que les acides polyhydroxybenzoïques sont détectés quantitativement, en UV, avec une excellente reproductibilité : la longueur d'onde λ = 310 nm permet d'obtenir une réponse sensible, sinon optimale, pour chacun (fig. 7).

Les spectres obtenus en phase solide peuvent être pris sur le produit séparé de ses impuretés (fig. 8), ce qui s'avère plus difficile à réaliser en phase liquide, où une purification préalable par CLCHP est nécessaire.

La fig. 8 présente les résultats obtenus pour quelques produits de référence. L'établissement de spectres U.V. sur les taches déjà séparées fournit une méthode extrêmement rapide, mais également sensible ((50 picomoles)) et reproductible (± 0,5 à 4 % entre plaques différentes) d'approche des propriétés physicochimiques des molécules.

IV - Les Glucides : spectres différentiels après révélation au Naphtyl-éthylène-diamine dichlorure (NEDIAC).

Le "NEDIAC" (7) révèle les oses, osamines et acides uroniques en taches brun-violet sur fond blanc. Le spectre des colorations ainsi obtenus permet, dans un certain nombre de cas, d'assigner aux glucides révélés par ce procédé des caractéristiques spécifiques (fig. 9).

CONCLUSION

La densitométrie quantitative, qui avait déjà atteint un degré de précision et de reproductibilité considérables, au cours de la dernière décade, offre maintenant, avec la généralisation de l'équipement de monochromateurs sur les appareils actuels, de nouvelles et très vastes possibilités analytiques avec la spectrophotométrie en phase solide, ou spectro-densitométrie.

Les appareils de dépôt des substances à analyser ont atteint, eux aussi, un très haut degré de précision et de facilité d'emploi, et la récente introduction de techniques d'élution forcée à haute pression (OPLC) est venue accroître la rapidité, ainsi que le pouvoir de résolution. Seule, la pulvérisation des plaques , opération délicate et source d'hétérogénéité, constitue encore un facteur limitant à la fiabilité quantitative : or nous avons vu tous les composés susceptibles d'absorber -si peu que ce soit- dans l'U.V. pouvaient maintenant, être analysés de manière extrêmement puissante : un nouvel essor semble donc promis aux techniques de CCM dont l'universalité et la souplesse d'emploi n'ont, par ailleurs, guère d'équivalent.

REFERENCES

(1) M. BOUNIAS, 1969 - Chimie Analytique, 51(2), 76.

(2) M. BOUNIAS, 1983 - L'analyse biochimique quantitative par nano chromatographie en couche mince. Masson, 205 pp.

(3) M. BOUNIAS, M.H. DAURADE et Y. LIZZI, 1988, Analusis,

(4) R. CHAUVIN, 1984 - C.R. Acad. Sc. (Paris), 299-III, 647.

(5) M.G. BRAY, W.W. THORPE et K. WHITE, 1950 - Biochem. J., 46, 271.

(6) C.F. VAN SUMERE, G. WOLF, H.J. TEUCHY et J. KINT, 1965, J. Chrom. 20, 48.

(7) M. BOUNIAS, 1980 - Analyt. Biochem., 106, 291.

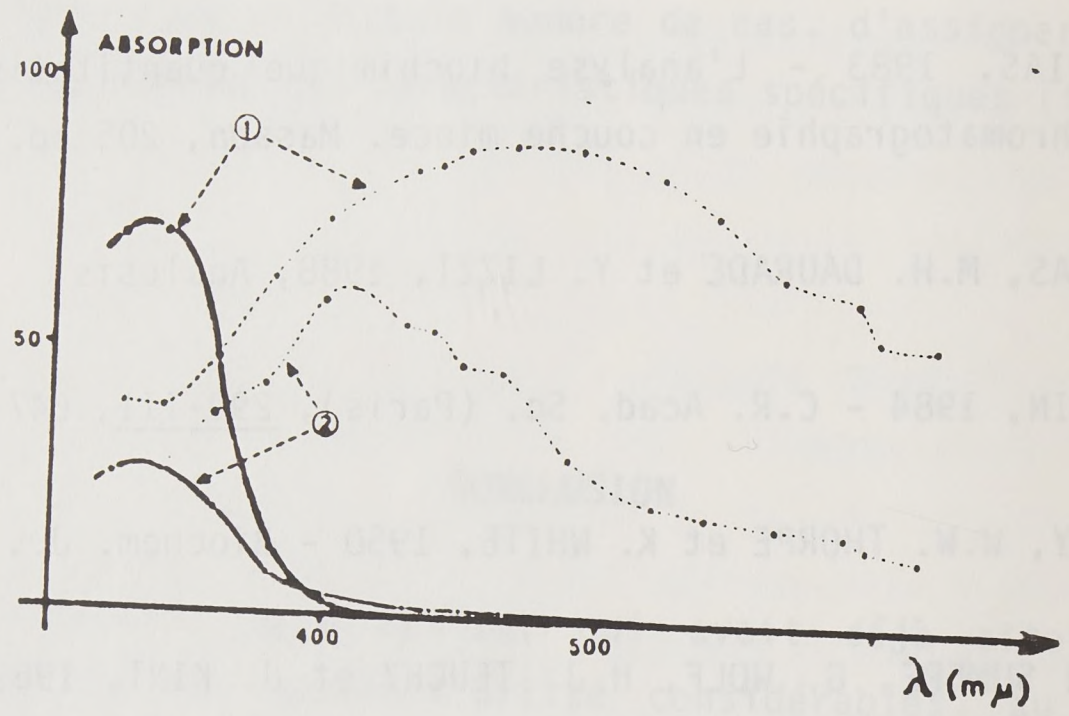


Fig. 1 - Exemples de spectres d'absorption sur couche de silice de composés non révélés (traits pleins) et révélés (pointillés). 1 : vitamines A_1 ; 2 : vitamine K_1.

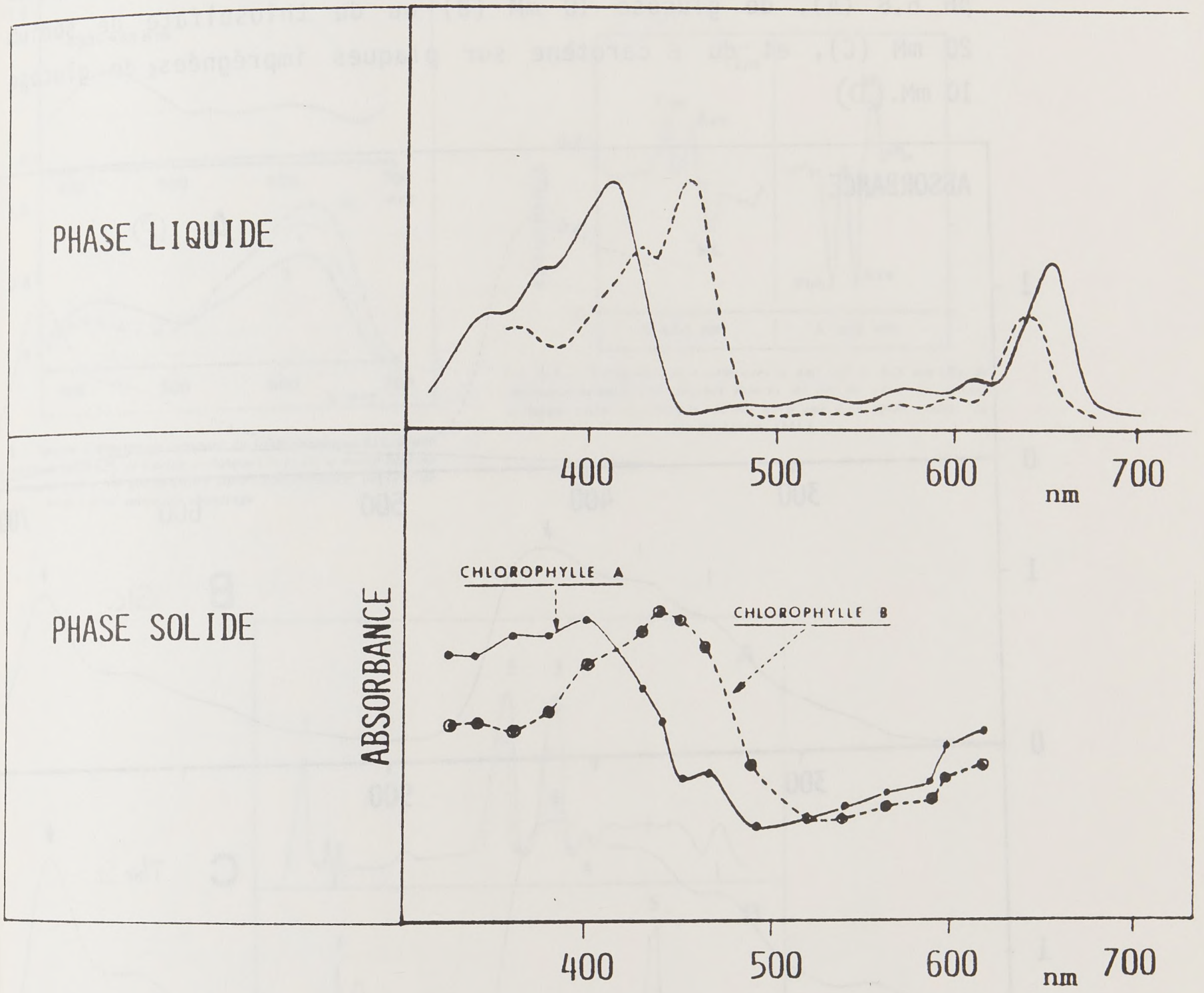
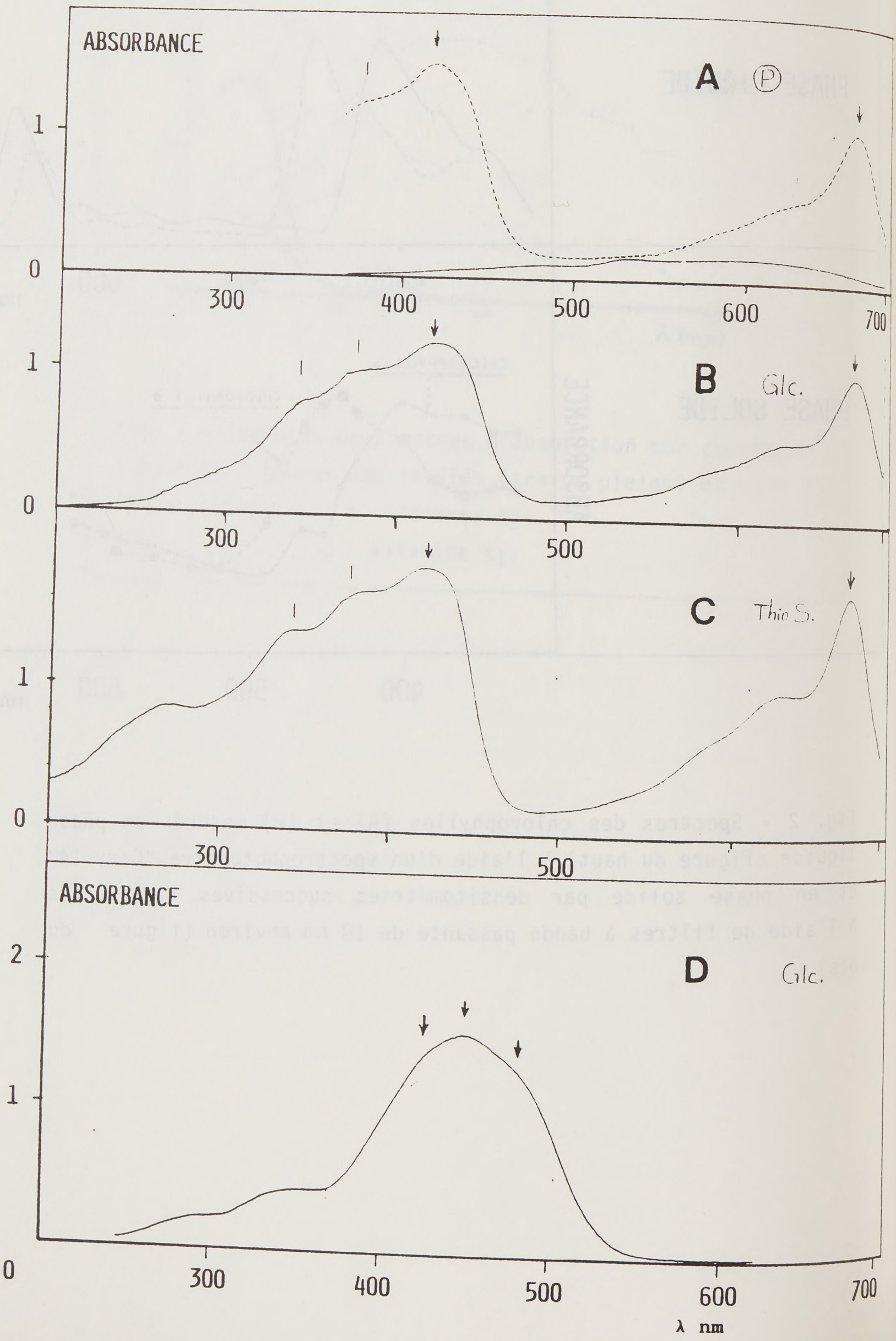


Fig. 2 - Spectres des chlorophylles (A) et (B) mesurés en phase liquide (figure du haut) à l'aide d'un spectrophotomètre "Cary 14" et en phase solide par densitométries successives des taches à l'aide de filtres à bande passante de 10 nm environ (figure du bas).

Fig. 4 - Spectres UV/visible en phase solide (gel de silice) de la chlorophylle A sur plaques imprégnées de tampon phosphate pH 6,8 (A), de glucose 10 mM (B) ou de thiosulfate de sodium 20 mM (C), et du β carotène sur plaques imprégnées de glucose 10 mM. (D)



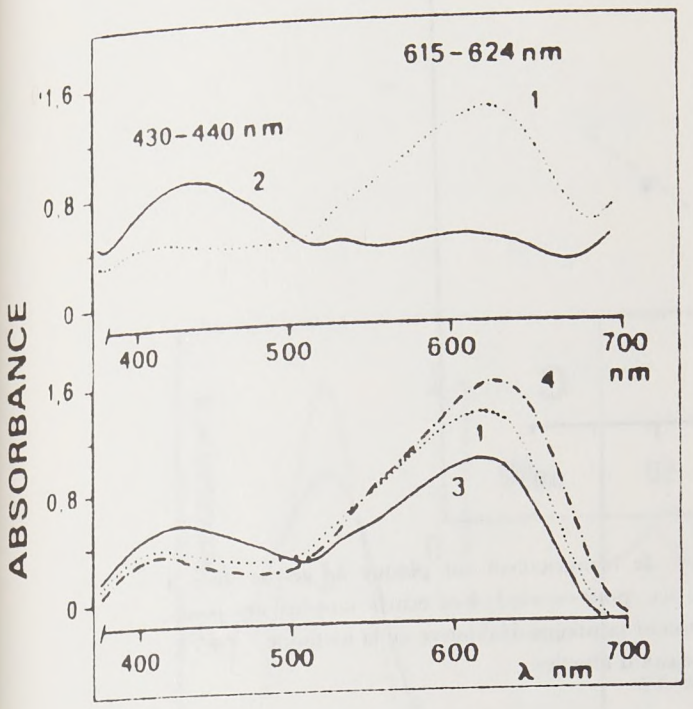


FIG. 5 – *Spectre d'absorption comparé du fond de plaque (1), d'une zone fortement acide (2), de l'acide azélaïque (3) et de la mono laurine (4) sur couche mince de gel de silice après pulvérisation de vert de bromocrésol suivie de chauffage*

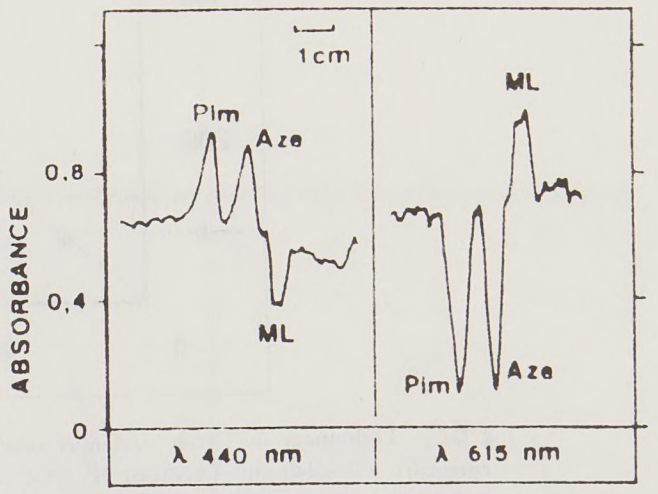


FIG. 6A – *Enregistrements comparés à 440 (A) et 615 nm (B) de chromatogrammes sur couches minces de gel de silice des acides azélaïque (Aze) et pimélique (Pim) ainsi que d'un lipide neutre : la mono laurine (ML).*

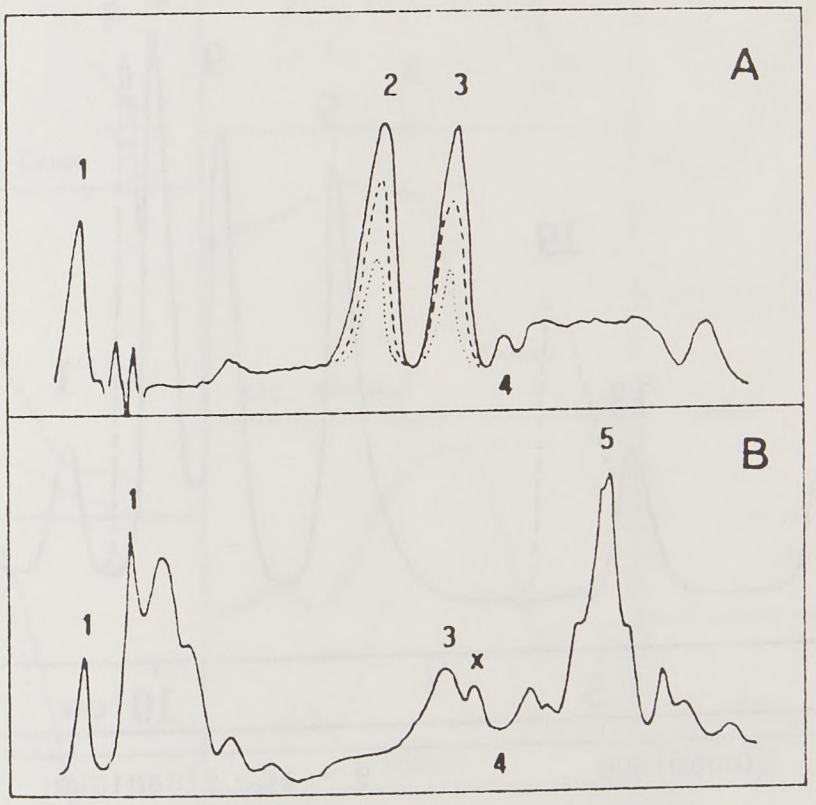


FIG. 6B – Enregistrements photométriques à 440 nm des chromatogrammes : A, Solution étalon ; B, Extrait des cerveaux de 20 abeilles. 1, phospholipides ; 2, acide pimélique ; 3, acide azélaïque ; 4, monoglycérides (non révélés) ; 5, acides gras à longues chaînes ; x, *composé non identifié. Dans le cas des acides* azélaïque et pimélique, les enregistrements superposés correspondent à 12,5 ; 25 et 50 nmoles.

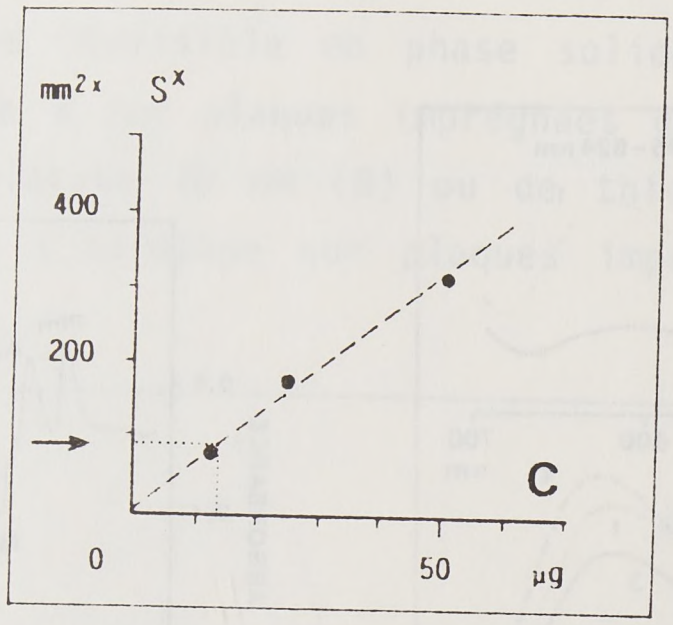
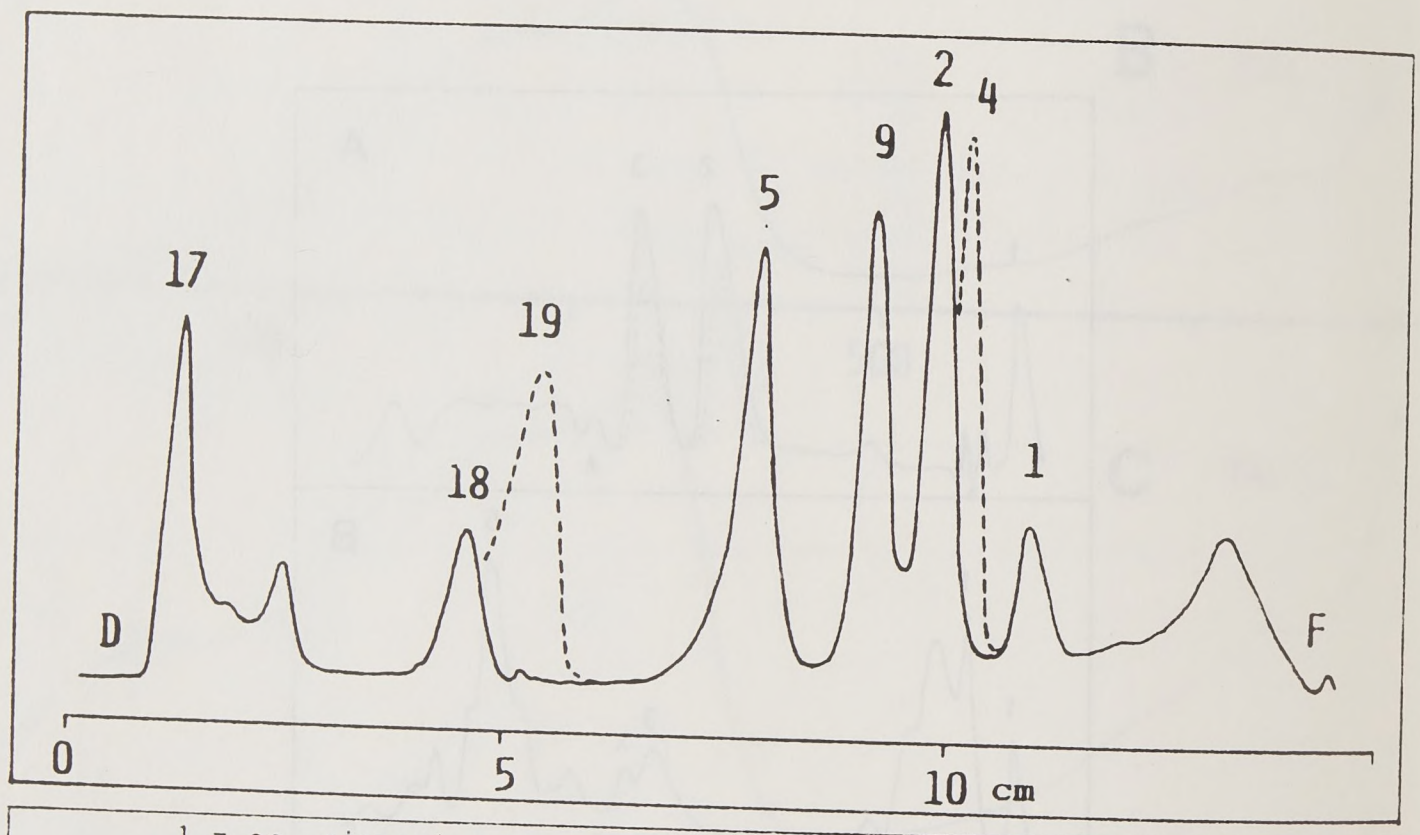


Fig 6c – Étalonnage de l'acide azélaïque révélé par le vert de bromocrésol sur plaque de gel de silice et enregistré à $\lambda = 440$ nm. La droite $S^x = p.C$ est obtenue, ici, pour $x = 1,2$. Les écarts moyens des points étalons par rapport à la droite de régression ($p = 0,998$) donnent la précision relative de la méthode : ± 4,9 %. La flèche indique les données relatives aux extraits de cerveaux d'abeilles.



1 = ac. cinnamique	9 = ac. sinapique
2 = ac. o. coumarique	17 = ac. chlorogénique
4 = ac. p. coumarique	18 = ac. o. protocatéchique
5 = ac. caféique	19 = ac. gentisique

Fig. 7 - Chromatogramme d'une série de phénols étalons (0,8 nmole par produit).

Enregistrements photométriques directs à λ = 310 nm. D = point de dépôts ; F = front supérieur de solvant.

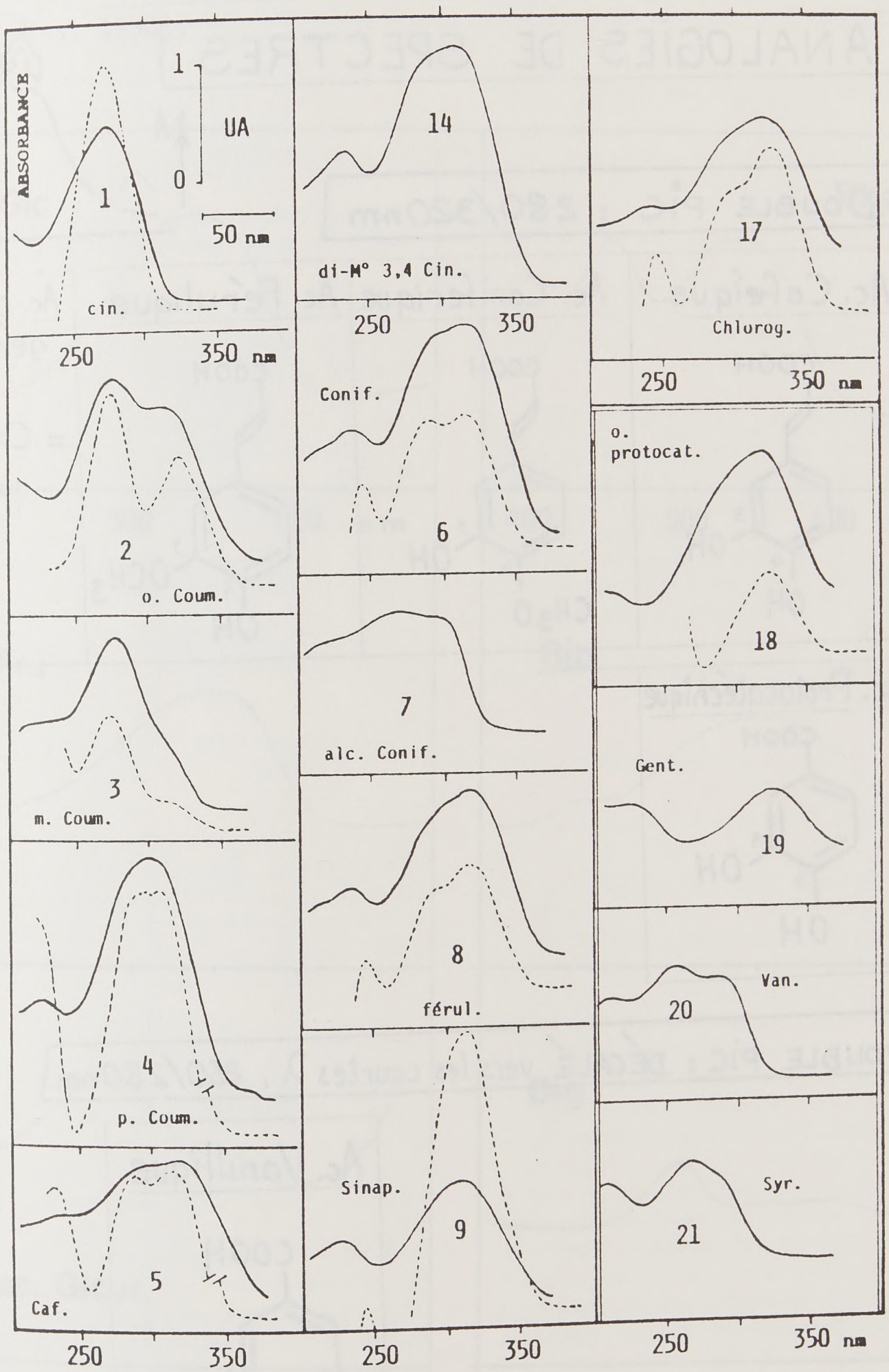
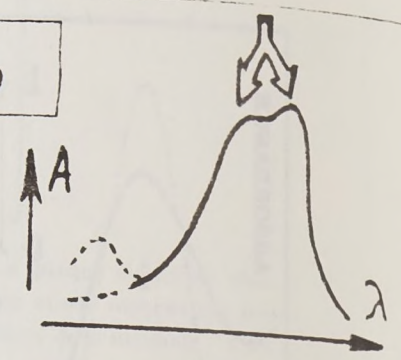


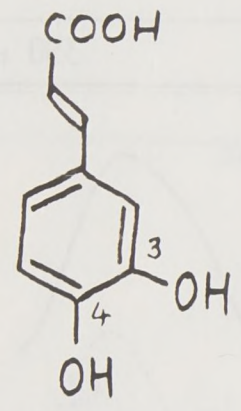
Fig. 8 - Spectres d'absorbance en phase solide (gel de silice : traits continus) et en phase liquide (éthanol : pointillés), d'une série de dérivés phénoliques des acides cinnamique (1 à 17) et benzoïque (18 à 21). Les composés sont désignés par leurs numéros comme précisé dans le texte. λ = longueurs d'ondes ; UA = unités d'absorbance.

ANALOGIES DE SPECTRES

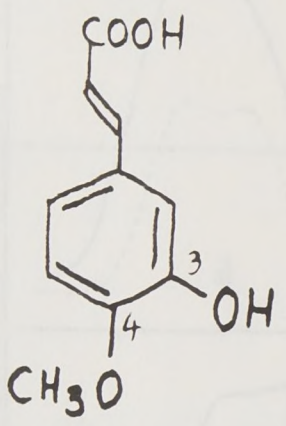


DOUBLE PIC : 280/320nm

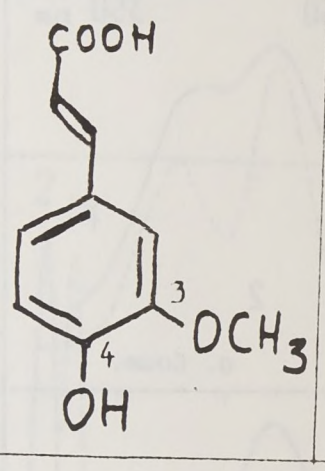
Ac. Caféique



Ac. Coniférique



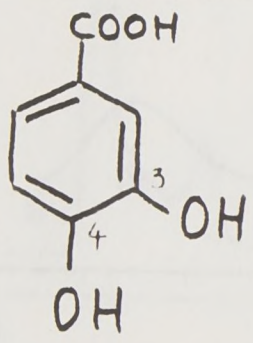
Ac. Férulique



Ac. Chlorogénique

= Caféyl-quinique

Ac. Protocatéchique



DOUBLE PIC : DÉCALÉ vers les courtes λ, 260/280nm

Ac. Vanillique

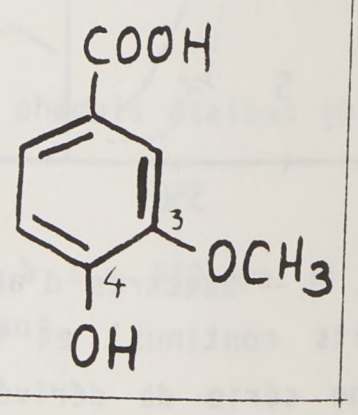
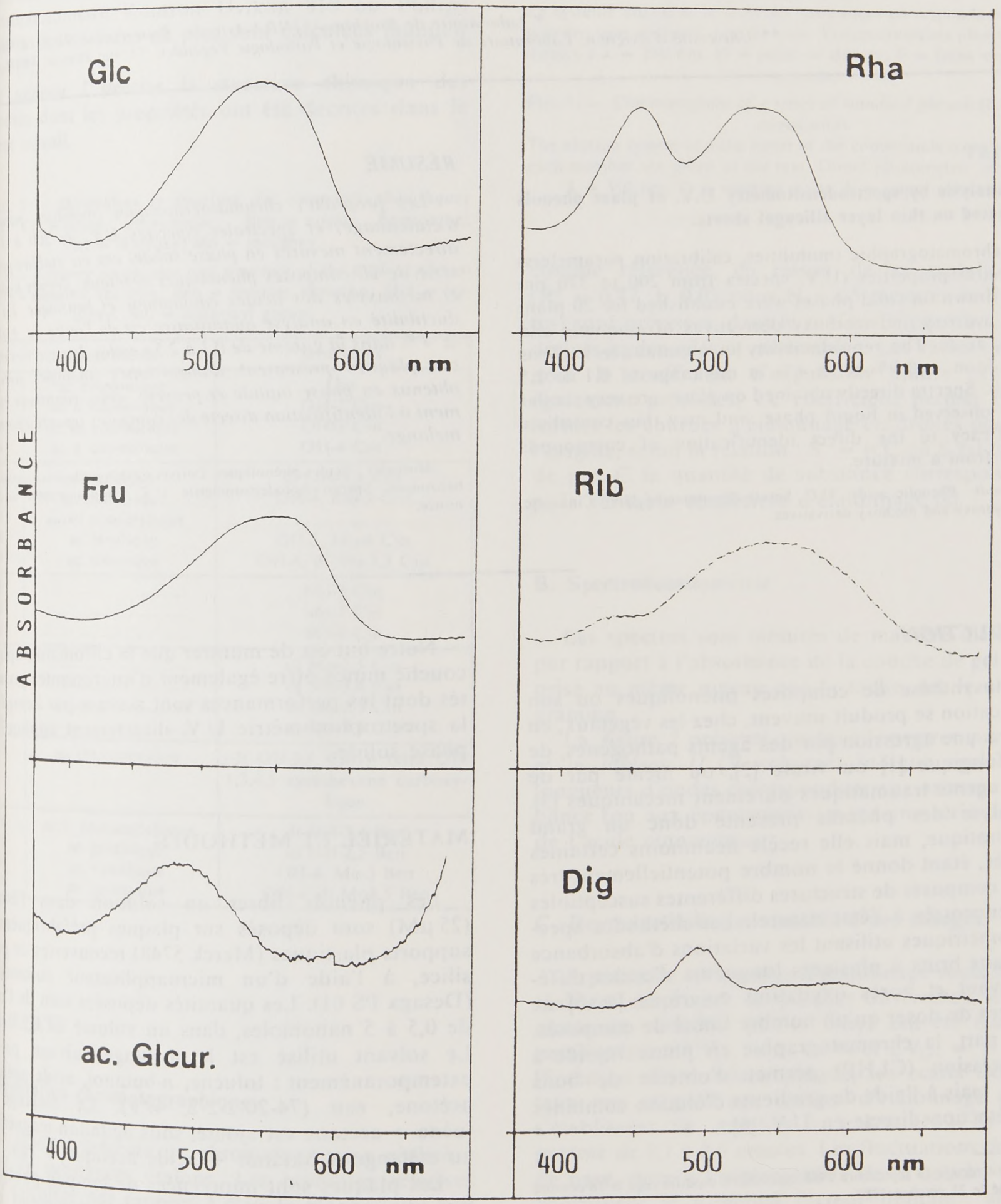


Fig. 9 - Spectres comparés de divers composés glucidiques et dérivés, après révélation sur couches de gel de silice au moyen du réactif au N-1 naphtyl-éthylène diamine dichlorhydrate (Bounias, 1980).



Analusis, 1988, v. 16, n° , p.

Analyse directe par spectrodensitométrie U.V. des phénols libres végétaux séparés sur couches minces de gel de silice.

M. BOUNIAS *, M.H. DAURADE * et Y. LIZZI **
Avec la collaboration technique de M. S. SERPEILLE *

* *Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, Boite Postale 91, 84140 Montfavet*
** *Université d'Avignon, Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétales, 33, rue Pasteur, 84000 Avignon*

SUMMARY

Direct analysis by spectrodensitometry U.V. of plant phenols separated on thin layer silicagel sheets.

The chromatographic (mobilities, calibration parameters) and spectral properties (U.V. spectra from 200 to 370 nm directly drawn on solid phase) were established for 20 plant phenol, hydroxy and methoxy derivatives of cinnamic and phenolic acids. The reproducibility in quantitative analysis spreads from ± 0.5 % to ± 4 % in the range of 0.1 to 2.5 nanomols. Spectra directly obtained on plates are very similar to those observed in liquid phase, and may thus contribute with efficacy to the direct identification of compounds resolved from a mixture.

Key-words : Phenolic acids. TLC. Spectrodensitometry U.V. Cinnamic, benzoic, hydroxy and methoxy derivatives.

RÉSUMÉ

Les propriétés chromatographiques (mobilités, paramètres d'étalonnage) et spectrales (spectres U.V. de 200 à 370 nm directement mesurés en phase solide) ont été établies pour une série de 20 composés phénoliques végétaux, dérivés hydroxylés et méthoxylés des acides cinnamique et benzoïque. La reproductibilité en analyse quantitative est de l'ordre de ± 0,5 % à ± 4 % dans la gamme de 0,1 à 2,5 nmoles. Les spectres mesurés sur plaques présentent d'importantes analogies avec ceux obtenus en phase liquide et peuvent, ainsi, contribuer efficacement à l'identification directe des composés séparés à partir d'un mélange.

Mots-clés : Acides phénoliques. Dérivés méthoxy et hydroxy cinnamique ou benzoïque. Spectrophotodensitométrie U.V. Chromatographie sur couche mince.

INTRODUCTION

La biosynthèse de composés phénoliques ou son intensification se produit souvent, chez les végétaux, en réponse à une agression par des agents pathogènes, de nature fongique [1] ou virale [2], ou même par de simples agents traumatiques purement mécaniques [3].

L'analyse des phénols présente donc un grand intérêt pratique, mais elle recèle néanmoins certaines difficultés, étant donné le nombre potentiellement très élevé de composés de structures différentes susceptibles d'être rencontrés à l'état naturel. Les méthodes spectrophotométriques utilisant les variations d'absorbance des extraits bruts à plusieurs longueurs d'ondes différentes avant et après oxydation cuivrique [4, 5] ne permettent de doser qu'un nombre limité de composés. D'autre part, la chromatographie en phase liquide à haute pression (CLHP) permet d'obtenir de bons résultats, mais à l'aide de gradients d'élution combinés à une détection directe en U.V. [6].

Manuscrit reçu le 13 septembre 1988; manuscrit modifié reçu le 18 octobre 1988; accepté le 21 octobre 1988.

Notre but est de montrer que la chromatographie en couche mince offre également d'intéressantes possibilités dont les performances sont accrues par l'emploi de la spectrophotométrie U.V. directement appliquée en phase solide.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les phénols libres en solution dans l'éthanol (25 µM) sont déposés sur plaques préfabriquées sur supports plastiques (Merck 5748) recouvertes de gel de silice, à l'aide d'un microapplicateur automatique (Desaga PS 01). Les quantités déposées sont de l'ordre de 0,5 à 5 nanomoles, dans un volume de 0,5 à 2 µl. Le solvant utilisé est le mélange suivant, préparé extemporanément : toluène, *n*-butanol, acide acétique, acétone, eau (74-20-2-2-2, *v/v*). Le mélange toluène + acétone est ajouté, sous agitation magnétique, au mélange *n*-butanol + acide acétique + eau.

Les plaques sont imprégnées de tampon phosphate 0,4 M, pH 6,8. Le développement comprend deux

migrations successives, la première sur 9 cm et la seconde sur 14 cm, séparées par un séchage complet des taches. Les durées moyennes de développement sont respectivement de 30 mn et 45 mn à 20 ± 0,5 °C.

Les taches sont enregistrées par lecture U.V. à l'aide d'un spectrodensitomètre CS930, à la longueur d'onde λ = 310 nm qui permet d'obtenir une réponse sensible du plus grand nombre de composés dans des conditions où aucun composé n'est perceptible à l'examen oculaire, même sous éclairage U.V., sur les plaques. Sur chaque tache séparée, une analyse spectrophotométrique est effectuée entre λ = 200 nm et λ = 370 nm directement sur les plaques et confrontée avec le spectre des mêmes composés en solution dans l'éthanol (spectrophotomètre Kontron Uvikon 810 ou Philips SP8-400). Les surfaces de pics sont calculées manuellement [7].

Le *tableau I* précise la structure chimique des composés dont les propriétés ont été décrites dans le présent travail.

TABLEAU I. — *Désignation et structure des composés phénoliques étudiés.* Cin = noyau cinnamique; Ben = noyau benzoïque; OH = Hydroxy; Mo = méthoxy.

TABLE I. — *Reference designation and structure of the studied phenolics.* Cin = cinnamic skeleton; Ben = benzoic skeleton; OH = hydroxyl; Mo = methoxyl group.

N°	Noms usuels	Structures
1	ac. cinnamique	Cin
2	ac. o. coumarique	OH-2 Cin
3	ac. m. coumarique	OH-3 Cin
4	ac. p. coumarique	OH-4 Cin
5	ac. caféique	di OH-3,4 Cin
6	ac. conifférique	OH-4, Mo-3 Cin
7	alcool coniférylique	.....
8	ac. férulique	OH-3, Mo-4 Cin
9	ac. sinapique	OH-4, di Mo-3,5 Cin
10	.....	Mo-2 Cin
11	.....	Mo-3 Cin
12	.....	Mo-4 Cin
13	.....	di Mo-2,3 Cin
14	.....	di Mo-3,4 Cin
15	.....	di Mo-2,5 Cin
16	.....	di Mo-3,5 Cin
17	ac. chlorogénique	(di OH-3,4 Cin)3- tetra OH 1,3,4,5 cyclohexane carboxylique
18	ac. o. protocatéchique	di OH-3,4 Ben
19	ac. gentisique	di OH-2,5 Ben
20	ac. vanillique	OH-4, Mo-3 Ben
21	ac. syringique	OH-4, di Mo3.5 Ben

RÉSULTATS

A. Séparation chromatographique

La *figure 1* présente un chromatogramme réalisé à partir de substances étalons. Les mobilités relatives (M_R) calculées par rapport à l'acide cinnamique pris comme référence, en raison de sa mobilité élevée (Rf = 0,77 ± 0,03 pour N = 65 mesures indépendantes) sont précisées, dans le *tableau II* pour une série de dérivés hydroxylés et méthoxylés. Les valeurs mesurées pour le coefficient d'expansion linaire (χ) y sont également précisées. Ce coefficient permet de transformer les courbes d'étalonnage en droites passant par l'origine, selon la relation : $S' = p.C$ où S est la surface de pic, C la quantité de substance correspondante et p. le véritable coefficient d'étalonnage [8].

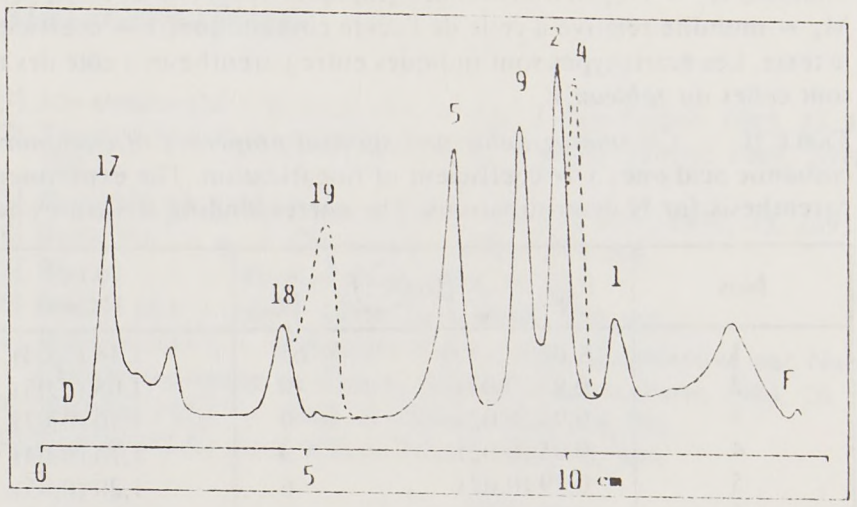


FIG. 1. — *Chromatogramme d'une série de phénols étalons* (0,8 nmole par produit).
Le système éluant et le nom des substances correspondant à chaque numéro sont indiqués dans le texte. Enregistrements photométriques directs à λ = 310 nm. D = point de dépôts; F = front supérieur de solvant.

FIG. 1. — *Chromatogram of a series of standard phenols* (0.8 nmol by compound).
The elution system and the name of the compounds corresponding to each number are given in the text. Direct photometric recordings at λ = 310 nm. D = spotting point; F = upper solvent front.

B. Spectrodensitométrie

Les spectres sont mesurés de manière différentielle par rapport à l'absorbance de la couche de gel de silice prise au même niveau que la tache, sur le chromatogramme.

La *figure 2* présente quelques spectres particuliers, et le *tableau II* (3e colonne) indique également les longueurs d'ondes correspondant aux extrema d'absorbance (ou aux épaulements) pour une série de dérivés de l'acide cinnamique.

C. Reproductibilité et sensibilité des dosages

A partir de 13 courbes d'étalonnage successivement réalisées sur autant de plaques différentes, les coefficients de variation ($CV = \bar{x}/\sigma_x$) ont été établis respectivement à $CV_{(x)} = \pm 1,8\,\%$ et $CV_{(p)} = \pm 7,9\,\%$. A l'intérieur d'une même plaque, les écarts expérimentaux par rapport aux droites d'étalonnage calculées s'établissent de ± 0,5 % à ± 4 % (N = 8) dans la gamme de 0,1 à 2,5 nmoles. Les fluctuations de la ligne de base, dues à l'hétérogénéité de la couche de silice, constituent le principal facteur limitant : ainsi, une

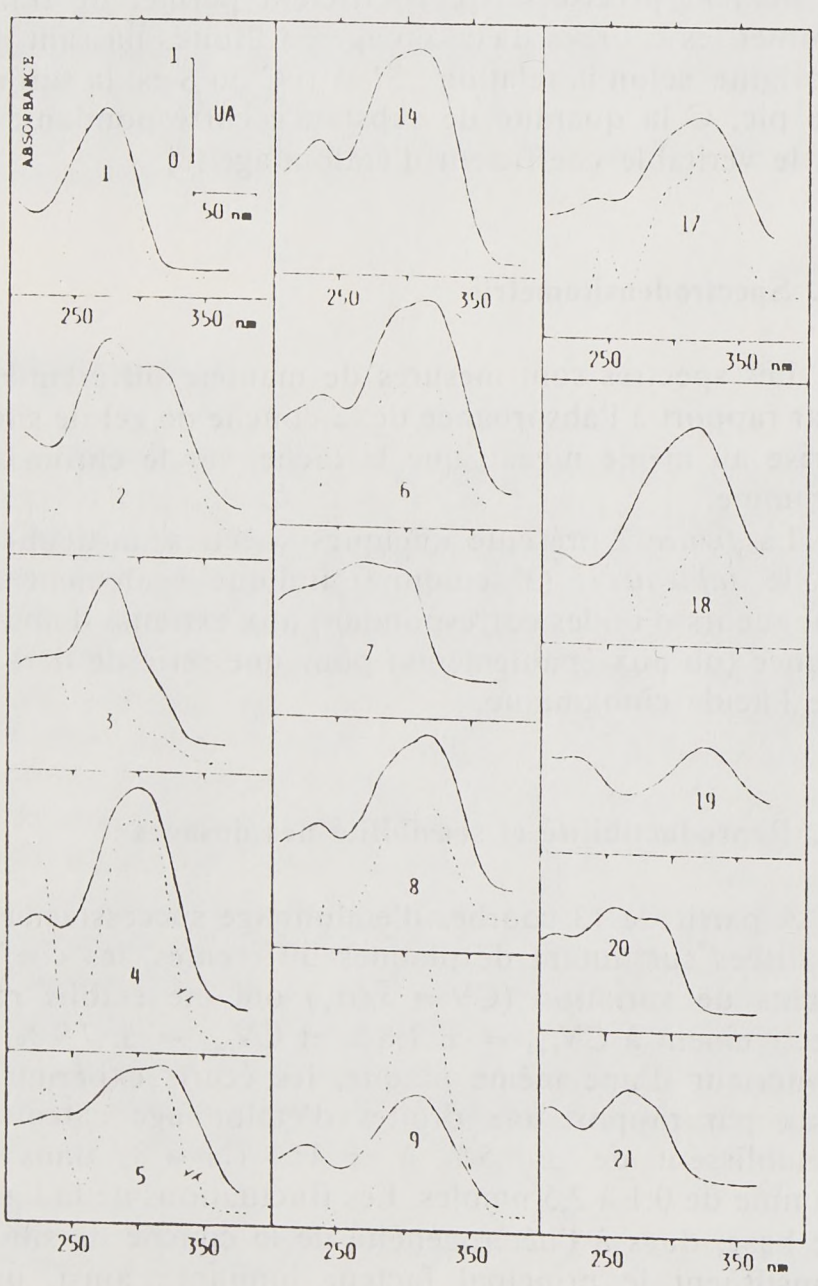
TABLEAU II. — *Propriétés chromatographiques et spectrales d'une série de composés dérivés de l'acide cinnamique* (OH = hydroxy; Mo = méthoxyl; M_R = mobilité relative à celle de l'acide cinnamique; x = coefficient d'expansion linéaire. Les conditions expérimentales sont celles décrites dans le texte. Les écarts-types sont indiqués entre parenthèses à côté des moyennes (au moins N mesures). Les structures correspondant à chaque numéro sont celles du *tableau I*.

TABLE II. — *Chromatographic and spectral properties of cinnamic derivatives* (OH = hydroxyl; Mo = methoxyl). M_R = relative mobility vs the cinnamic acid one; x = coefficient of linearization. The experimental conditions are described in the text. Standard deviations are given between parenthesis for N determinations. The corresponding structures are explicided in *table I*.

Nos	M_R (σ) (N)	x (σ) (N = 4)	(nm) maxima	épaulements	minima
1	1,00 65	1,16 (0,04)	**276**	—	227
2	0,93 (0,02) 9	1,05 (0,05)	**274** 318	—	230 300
3	0,91 (0,02) 9	1,10 (0,02)	**277**	235 ± 5 310	—
4	0,95 (0,02) 9	1,16 (0,04)	224 **294**	—	245
5	0,79 (0,02) 6	1,20 (0,05)	239 **314**	241 ± 4 284	(257)
6	0,90 (0,02) 6	1,25 (0,07)	237 ± 2 **315**	281 294	223 252 ± 1
7	0,70 (0,04) 2	—	**268 ± 2**	221 296	—
8	0,87 (0,01) 6	1,30 (0,07)	234 **316**	279 290	253 ± 2
9	0,85 (0,01) 2	—	240 **308**	—	253
10	1,02 (0,01) 6	1,28 (0,02)	**276** 317	—	236 303
11	0,99 (0,01) 6	1,22 (0,04)	230 **276**	218	240
12	1,01 (0,01) 6	1,02 (0,04)	219 **286 ± 4**	—	240
13	0,98 (0,01) 5	1,14 (0,08)	227 **278**	—	243
14	0,95 (0,01) 5	1,28 (0,05)	231 **309**	294	252
15	1,00 (0,01) 5	1,26 (0,03)	236 -274- 340	219 239	310
16	0,99 (0,01) 5	1,32 (0,04)	222 **283**	—	249

Le signe ± indique un plateau.
Les pics principaux sont mentionnés en caractères gras.

erreur relative maximale de l'ordre de 20 % peut entacher, par exemple, le dosage de l'acide caféique pour des quantités déposées avoisinant 50 picomoles.



DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La séparation des phénols par chromatographie sur couche mince est une technique appelée à se développer en raison de sa facilité de mise en œuvre [9]. Sur couches minces de gel de silice, les composés phénoliques sont élués dans l'ordre exactement opposé de celui observé sur colonnes à phase inversée [4]. Le système décrit permet d'obtenir la résolution d'une série de composés présentant des différences structurales suffisamment importantes. Cependant, les systèmes appropriés devront être élaborés pour des familles telles que celle des divers dérivés méthoxylés de l'acide cinnamique.

Les spectres réalisés directement en phase solide présentent de fortes analogies avec ceux observés en phase liquide, ces derniers montrant, toutefois, un tracé plus découpé. Les quantités totales nécessaires pour obtenir un spectre sont de l'ordre de 10^{-10} moles sur plaque, et de 10^{-8} moles dans une cuve de 0,4 ml.

L'élimination d'opérations intermédiaires telles que la révélation chimique ou l'élution des taches permet d'opérer avec une grande reproductibilité absolue. Le paramètre x, facteur qualitatif lié à la structure de

FIG. 2. — *Spectres d'absorbance en phase solide* (gel de silice : traits continus) *et en phase liquide* (éthanol : pointillés), *d'une série de dérivés phénoliques des acides cinnamiques* (1 à 9 et 17) *et benzoïque* (18 à 21). Les composés sont désignés par leurs numéros comme précisé dans le *tableau I*. λ = longueurs d'ondes; UA = unités d'absorbance.

FIG. 2. — *Absorbance spectra in solid phase* (silicagel : full lines) *and liquid phase* (ethanol : dotted lines) *of a series of phenolic derivatives of cinnamic acid* (1 to 9 and 17) *and benzoic acid* (18 to 21). Compounds are identified by their numbering, as indicated in *table I*. λ = wavelength; UA = absorbance units.

chaque composé [8] présente la variabilité la plus faible, tandis que le paramètre *p*, essentiellement quantitatif, parait davantage assujetti aux facteurs matériels et opératoires pouvant différer d'une plaque à l'autre.

Il est important de souligner, enfin, qu'en milieu acide (HCl 2N) certaines modifications paraissent apportées à certains composés phénoliques dissous, de telle sorte que leur mobilité ou leur spectre en restent modifiés sur plaques. Ce point fait l'objet de recherches en cours, étant donné son importance dans le cas de l'étude d'aglycones libérés après hydrolyse d'hétérosides.

BIBLIOGRAPHIE

[1] JOHANSSON (M.), STENLID (S.). — *Eur. J. For. Pathol.*, 1985, *15*, 32.
[2] TANGUY (J.), GALLET (M.). — *C.R. Acad. Sc. (Paris)*, 1969, *269D*, 589.
[3] FLEURIET (A.), MACHEIX (J.J.). — *Physiol. Vég.*, 1977, *15*, 239.
[4] BUTA (G.J.). — *J. Chromatogr.*, 1984, *295*, 506.
[5] BILLOT (J.). — *Physiol. Veg.*, 1980, *18*, 655.
[6] BILLOT (J.). — *Anal. Chim. Acta*, 1980, *119*, 367.
[7] BOUNIAS (M.). — L'Analyse Biochimique Quantitative par Nano Chromatographie en Couche Mince, *Masson*, Paris, 1983, 26.
[8] BOUNIAS (M.). — *Anal. Biochem.*, 1980, *106*, 291.
[9] KURTH (M.J.). — *J. Chem. Educ.*, 1986, *63*, 360.

Analusis

Regression de l'oxydation artéfactuelle des pigments chlorophylliens chromatographiés sur couches minces de gel de silice, par imprégnation des plaques au glucose ou au thiosulfate.

M. BOUNIAS et Mme M.H. DAURADE

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE, INRA-AVIGNON

B.P. N°91, 84140 MONTFAVET (FRANCE)

RESUME

La chromatographie des pigments photosynthétiques sur couches minces de gel de silice présente, en contre partie d'une bonne résolution, l'inconvénient de faciliter la dégradation oxydative des chlorophylles ayant été préalablement fragilisées par les conditions d'extraction et/ou l'état physiologique du végétal. L'imprégnation des plaques par le thiosulfate (10 à 20 mM) rétablit complètement la structure primitive des chlorophylles, mais altère celle des caroténoïdes. Un compromis est obtenu avec l'imprégnation des plaques par un réducteur doux, le D-glucose (125 mM) qui préserve l'intégrité des caroténoïdes tout en présentant une efficacité réductrice satisfaisante (85 %) vis-à-vis des chlorophylles pré-altérées.

Mots clés : CCM gel de silice, dosage chlorophylles a et b, β carotène, lutéine, artefact, thiosulfate.

Titre abrégé : traitement anti oxydant des chlorophylles en C.C.M.

SUMMARY

Quenching of the artifactual oxidation of chlorophyll pigments chromatrographed on silicagel thin layers by impregnation of plates with glucose or thiosulfate.

Chromatography of photosynthetic pigments on silicagel thin layers offers a good resolution but facilitates the artifactual oxidation of chlorophylls previously fragilized by the conditions of extraction and/or the physiological state of the plant. The impregnation of plates with 10 to 20 mM thiosulphate completely restores the primary structure of chlorophylls, but alters the structure of carotenoïds. A compromise is obtained by impregnating the plates with a mild reductor : D glucose (125 mM) which preserves the carotenoïds integrity while exhibiting a satisfactory (85 %) antioxidant capacity towards chlorophylls.

Keywords : TLC, silicagel, quantification, chlorophylls a and b, β carotène, lutein, , artifact.

INTRODUCTION

Le gel de silice reste l'une des phases solides les plus employées, en chromatographie en couche mince, en attendant que se développent des techniques utilisant les nouvelles couches maintenant disponibles. Il constitue, en particulier, un matériau de choix pour la résolution des divers pigments photosynthétiques [1]. Malheureusement, si les caroténoïdes ne posent guère de problèmes, il en va différemment des chlorophylles, et plus particulièrement de la chlorophylle a, dont le gel de silice tend à favoriser d'autant plus l'autoxydation que la molécule se trouve sous une forme sensibilisée par les conditions d'extraction, d'une part et par l'état physiologique du végétal, d'autre part. Il en résulte une décomposition des formes initiales en dérivés a', a", b', b" qui représentent des stades successifs d'oxydation [2-4]. Nous avons donc cherché à éviter l'autoxydation des pigments en cours de migration (ce qui se traduit par des traînées et une multiplication des taches), et même à rétablir des formes préoxydées à l'état réduit initial, au moyen de traitements réducteurs tels que le dithionite [5]. Ceux-ci pouvant, malheureusement, réduire le ß carotène et atténuer son absorbance, nous avons cherché un moyen terme entre l'efficacité réductrice vis-à-vis des chlorophylles et la préservation de la structure du ß carotène.

METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

Les chlorophylles a et b, le ß carotène et la lutéine à l'état pur ont été fournis par Sigma (réf. resp. : C5753, C5878, C0126 et X6250).

Les pigments chlorophylliens extraits ou dissous dans le chloroforme, sont déposés sur plaques de gel de silice 60 préfabriquées sur support plastique (Merck, TLC réf. n°5748). Les opérations d'imprégnation sont effectuées par trempage. Les migrations s'effectuent à 19 ± 1°C à l'obscurité au moyen d'un solvant binaire composé du mélange heptane/acétate d'éthyle, dans les proportions variant de 45/55 à 55/45 (v/v) (fig. 1). L'enrichissement en cyclohexane réduit les mobilités et augmente l'écart entre ß carotène et les pigments porphyriniques. Les distances de migration sont de l'ordre de 35 ± 5 mm.

Les enregistrements sont effectués à l'aide d'un spectro-densitomètre Shimadzu CS 930, à la longueur d'onde = 425 nm qui offre l'absorbance la plus homogène pour l'ensemble des chlorophylles et caroténoïdes.

RESULTATS

A - Protection des chlorophylles. La figure 2 illustre quelques exemples de l'état initial d'oxydation, se traduisant sur plaques non traitées par l'apparition de 3 à 5 formes dégradées, et du retour, sous l'action des agents réducteurs, à

une forme moléculaire principale correspondant à l'état naturel réduit.

La figure 3 précise les variations du taux d'efficacité des traitements en fonction des concentrations en réducteurs, thiosulfate et glucose. La proportion de molécules réduites relativement à l'ensemble des formes présentes, atteint 92 % avec 20 mM de thiosulfate et près de 80 % avec 125 mM de glucose.

Le traitement des plaques ne modifie ni les paramètres de migration, ni la position des pics du spectre d'absorbance des chlorophylles tel qu'il est possible de le mesurer en phase solide [6]. Les courbes d'étalonnage des chlorophylles établies en présence de thiosulfate ou de glucose présentent des coefficients logarithmiques d'expansion linéaire (x, tel que $S^x = p.C$ où S = surface du pic, C = quantité déposée et p = coefficient d'étalonnage [7]) légèrement supérieurs à 1 (tableau 1).

B - Répercussions sur les caroténoïdes . La figure 4A présente les résultats obtenus sur le ß carotène en fonction du temps et des concentrations d'antioxydants. En l'absence de traitement, l'absorbance de la molécule décroît à la vitesse constante de 4,8 ± 0,2 % de la valeur initiale par heure. En présence de glucose, à la concentration de 125 mM, cette diminution reste comparable : 4,2 ± 0,4 % par heure. Par contre, la décroissance devient extrêmement importante en présence de thiosulfate : elle est alors de type hyperbolique,

avec un taux initial moyen de l'ordre de 38,5 ± 11,5 % au cours des premières 45 mn. Le temps nécessaire aux dépôts et aux migrations suffit à abaisser de près de 40 % les résultats des premières mesures effectuées aussitôt après le développement. La fig. 4C montre, en revanche, que l'absorbance du ß carotène ne décroît pas en fonction des doses croissantes de glucose. Le spectre du ß carotène n'est pas affecté par l'imprégnation au glucose [6] et sa courbe d'étalonnage est linéaire (tableau 1).

L'absorbance de la lutéine décroît linéairement de 5,0 ± 1,0 % par heure au cours des 5 h qui suivent le développement, sur plaques imprégnées de glucose (10 mM) (fig. 4B). Cette décroissance correspond à une dégradation spontanée, et reste indépendante de la présence du glucose dont les concentrations croissantes ne montrent aucun effet significatif (fig. 4D).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'imprégnation des plaques recouvertes de gel de silice par le thiosulfate (10 à 20 mM) permet de restaurer chacune des chlorophylles (a) et (b) dans sa forme principale originelle, dans des conditions où l'absence de traitement conduirait à l'apparition de traînées en cours de développement ou à la séparation de deux à trois formes majoritaires préoxydées.

Un tel résultat n'est pas atteint par le traitement des plaques au chlorure de magnésium qui permet seulement d'éviter la dégradation trop rapide des chlorophylles en phéophytines par perte du noyau de magnésium de la porphyrine [5].

Malheureusement, le pouvoir réducteur du thiosulfate est tel qu'il entraîne une altération de la structure chromophore du β carotène, faite de doubles liaisons conjuguées, et entraîne rapidement une importante perte d'absorbance de ce pigment sur les plaques.

Le recours à un réducteur doux, le D-Glucose, offre un compromis permettant à la fois de préserver l'intégrité de la structure des caroténoïdes, et de rétablir celle de la structure des chlorophylles, lorsque celles-ci se présentent dans un état de déstabilisation moléculaire, dans une proportion atteignant 85 % de l'efficacité du thiosulfate.

L'amélioration ainsi apportée à la chromatographie des pigments photosynthétiques sur couches minces de gel de silice, devrait permettre de continuer à exploiter les capacités résolutives de cette phase, en attendant la mise au point de nouvelles méthodes sur des phases de type inverse que l'on peut espérer moins agressives vis-à-vis de la structure des pigments.

BIBLIOGRAPHIE

[1] BOUNIAS (M.). - in : *L'Analyse Biochimique Quantitative par Nano Chromatographie en Couche Mince*, Masson (Paris), 1983, p. 102.

[2] JOHNSTON (L.G.) et WATSON (W.F.). - *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78, 1203.

[3] STANIEDA (A.). - Naturwissenschaften, 1963, 50, 731.

[4] STRAIN (H.H.). - J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 5195.

[5] BOUNIAS (M.). - C.R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1984, 13, 52.

[6] BOUNIAS (M.) et DAURADE (M.H.). - Coll. Internat. C.C.M. Paris, Oct. 1988

[7] BOUNIAS (M.). - Analyt. Biochem., 1980, 106, 291.

[8] BOUNIAS (M.). - Comp. Biochem. Physiol., 1979, 63B, 407.

Tableau 1 - Coefficients exponentiels (x) de linéarisation des courbes d'étalonnage des chlorophylles et caroténoïdes sur plaques de gel de silice imprégnées d'anti oxydants (moyennes ± écarts-types pour N=3 mesures indépendantes). (Surface de pic)^x = p.(concentration).

	$Na_2S_2O_3$ (10 mM)	Glucose (10 mM)
chlorophylle (a)	1,44 ± 0,20	1,10 ± 0,05
chlorophylle (b)	1,33 ± 0,30	1,18 ± 0,18
ß carotène	-	1,07 ± 0,15
lutéine	-	1,58 ± 0,17

Table 1 - Exponential coefficients (x) corresponding to the linearization of calibration curves of chlorophylls and carotenoïds on silicagel precoated sheets impregnated with anti-oxidants. (Means ± S.D. for 3 independant determinations). (Peak area)^x = p.(concentration).

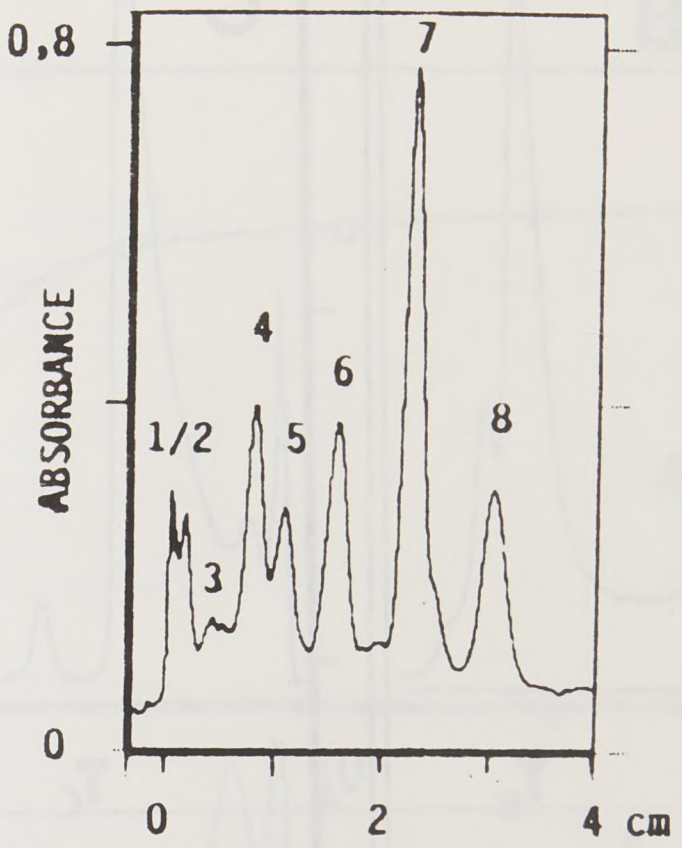


Figure 1 - Chromatogramme de pigments photosynthétiques extraits de feuilles de bouleaux. Solvant : heptane - acétate d'éthyle (55/45, v/v), température 18°C. Durée 4 mn 30. 1/2 = Phéophorbides et Néoxanthine ; 3 = Violaxanthine ; 4 = Lutéine ; 5 = Chlorophylle (b) ; 6 = chlorophylle (a) ; 7 = Phéophytine (a) ; 8 = β carotène.

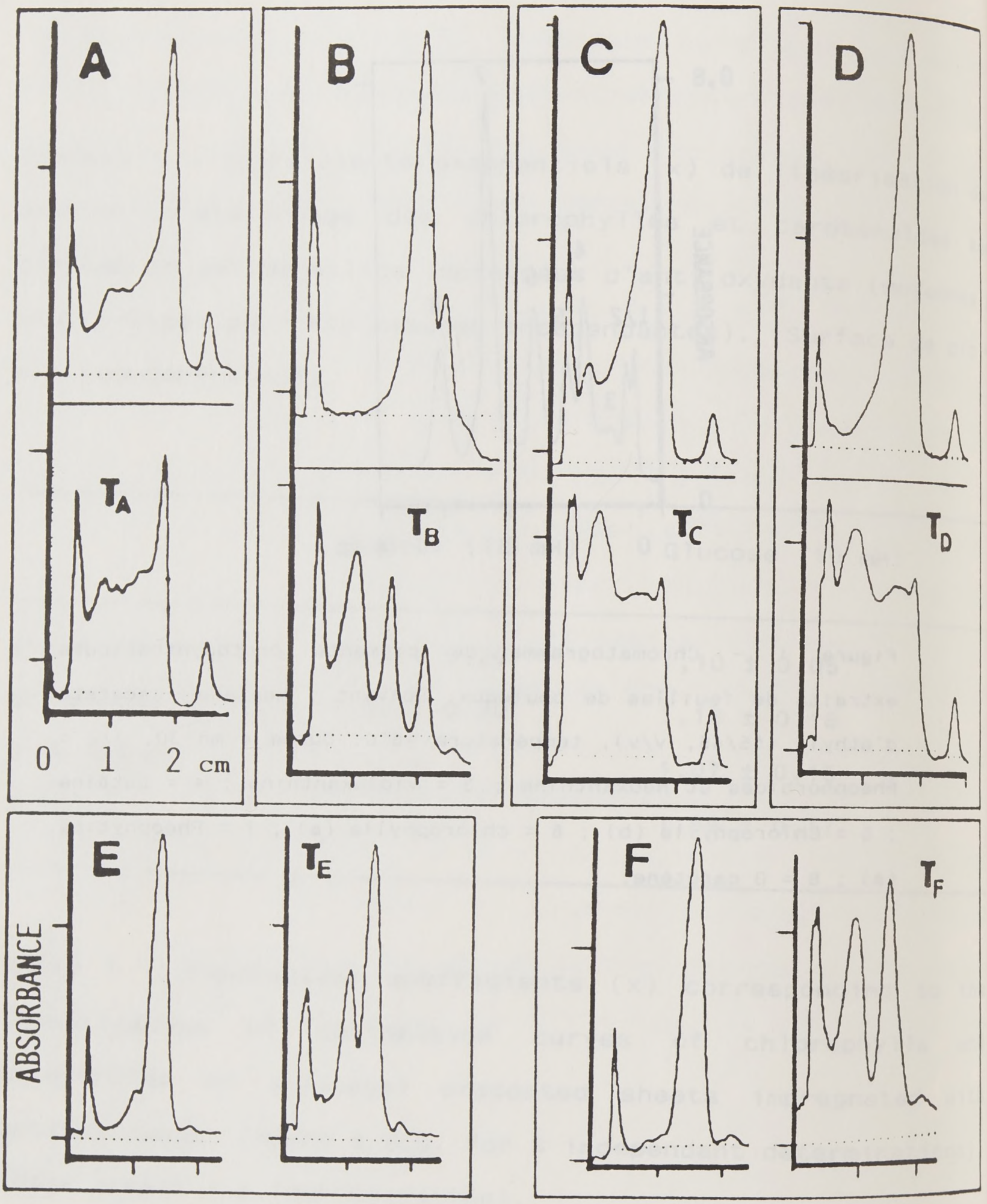


Figure 2 - Effets qualitatifs des agents réducteurs sur la distribution des formes moléculaires des chlorophylles (0,8 nanomole) chromatographiées sur gel de silice . Chlorophylle (a) : A = Glc 1 mM ; B = Glc 125 mM ; C = thiosulfate 2,5 mM ; D = thiosulfate 20 mM ; chlorophylle (b) : E = Glc 1 mM ; F = thiosulfate 10 mM. T = témoins correspondants sur plaques non traitées. Abscisses et ordonnées : comme sur la figure 1.

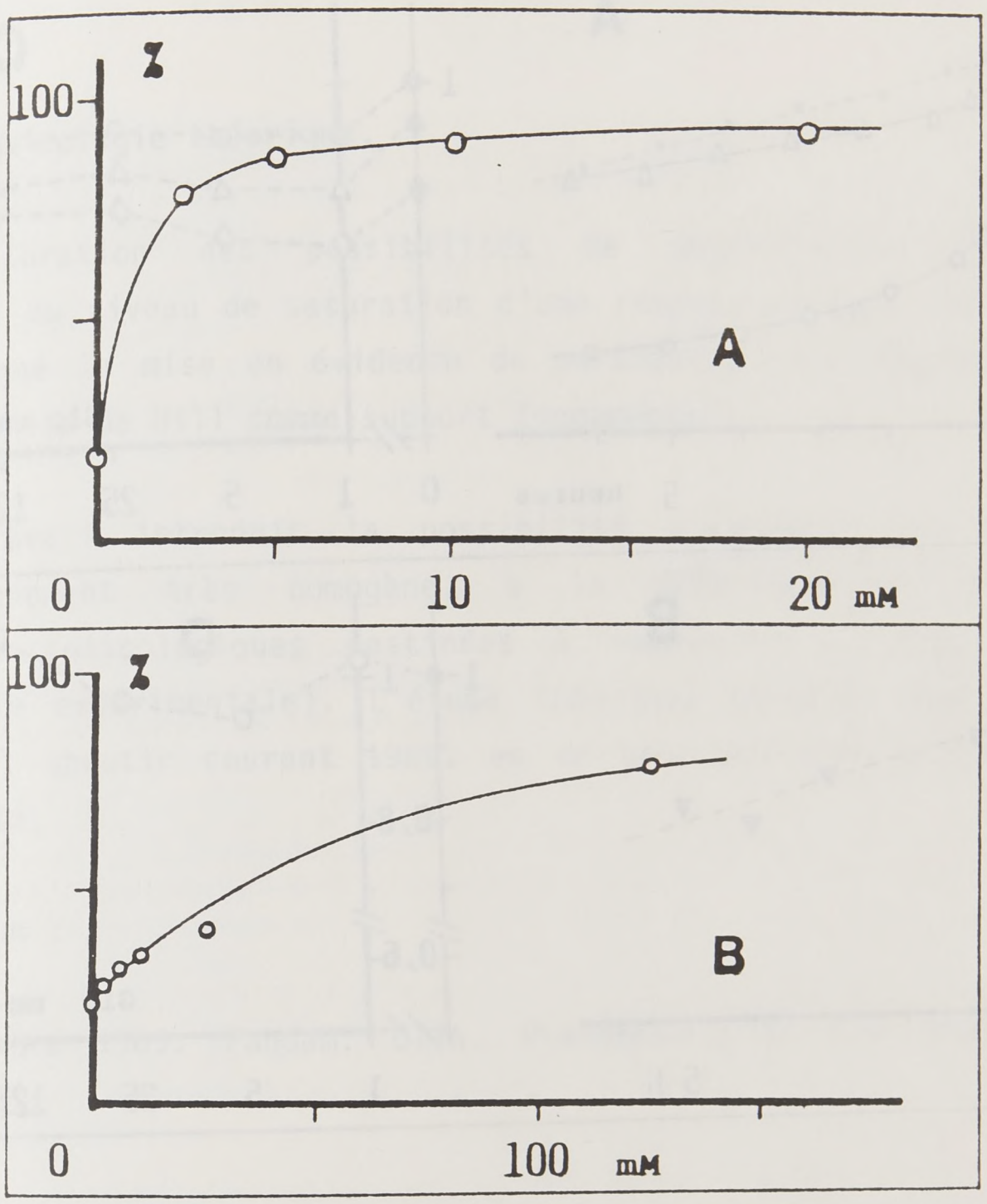


Figure 3 - Action de concentrations croissantes en thiosulfate (A) et en glucose (B) sur le rendement de transformation des formes oxydées de chlorophylle (a) en forme pure réduite (R = forme pure/formes totales). La limite supérieure asymptotique, calculée d'après l'équation de Hill [8]
est : Rm = 94,5 %.

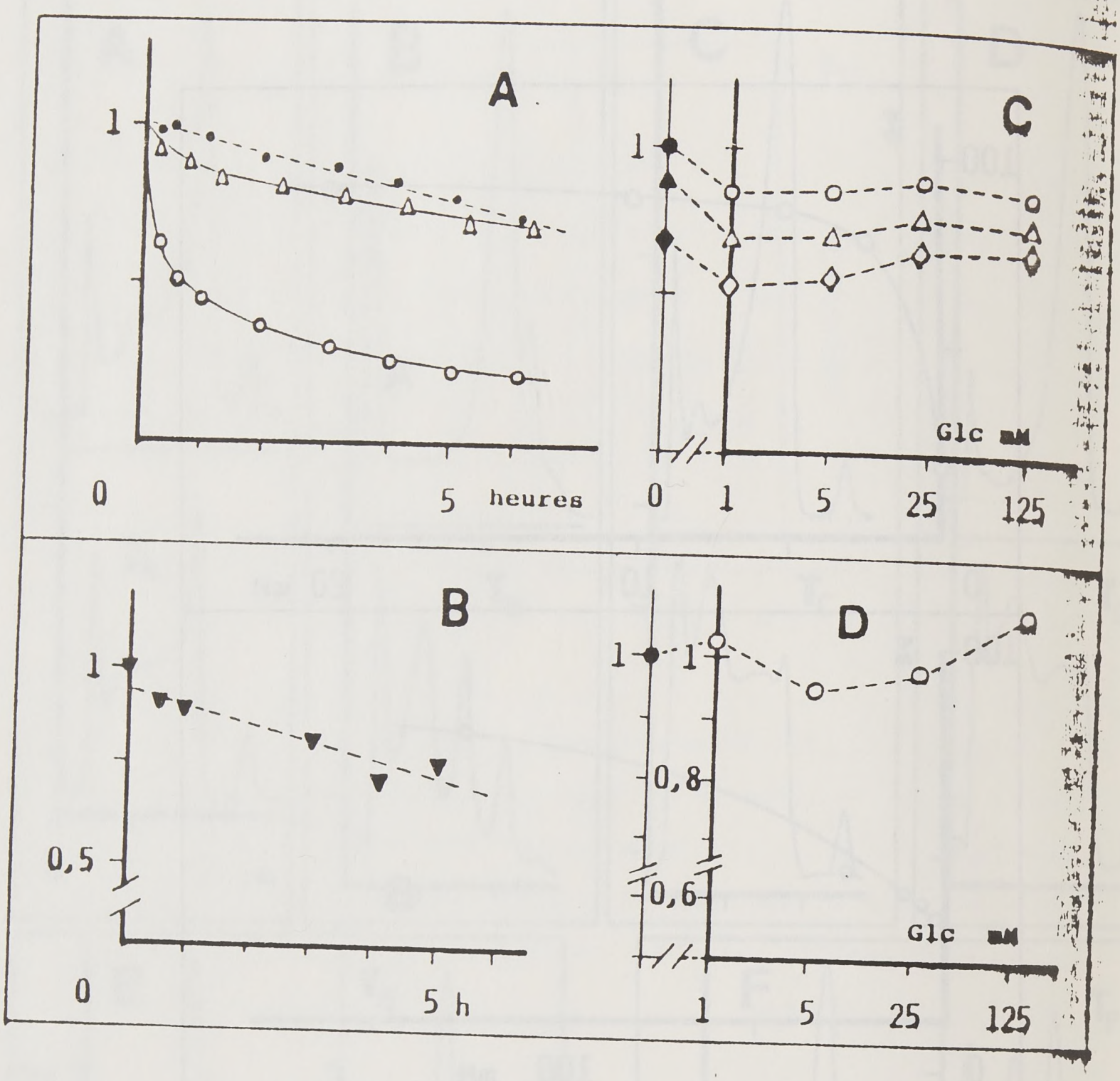


Figure 4 - Décroissance en fonction du temps de l'absorbance relative du β carotène (A) et de la lutéine (B) sur plaques de gel de silice non traitées (●) ou imprégnées de thiosulfate 10 mM (o) ou de glucose : 125 mM (Δ) ou 10 mM (▼). Action de concentrations croissantes de glucose (échelle log.) sur l'absorbance relative du β carotène (C) et de la lutéine (D), au bout de 1 h (o), 3 h (Δ) et 6 h (◇). (Les valeurs obtenues sur plaques non traitées sont précisées sur un axe séparé). Les corrélations en coordonnées naturelles ne sont pas significatives de même que les pentes de régression qui s'établissent à ± 0,1 %.mM^{-1}.

III - BIOCHIMIE TOXICOLOGIQUE

A - Toxicologie théorique.

L'amélioration des possibilités de détermination algébrique rigoureuse du niveau de saturation d'une réponse du type doses/effets a accompagné la mise en évidence de paramètres toxicologiques basés sur l'équation de Hill comme support fondamental.

Ce travail introduit la possibilité d'accéder, par une voie mathématiquement très homogène, à la définition de véritables constantes toxicologiques destinées à remplacer la DL_{50} (voir § toxicologie expérimentale). L'étude théorique générale est en cours et devrait aboutir courant 1989, en ce qui concerne les paramètres de létalité.

Publication :

BOUNIAS, M., 1989. Fundam. Clin. Pharmacol., **3**, 1-9 (acceptée en juillet 88)

Fundam. Clin. Pharmacol., 3 (1989) 1–9
© Elsevier, Paris

ALGEBRAIC POTENTIAL OF THE HILL EQUATION AS AN ALTERNATIVE TOOL FOR PLOTTING DOSE (OR TIME)/EFFECTS RELATIONSHIPS IN TOXICOLOGY: A THEORETICAL STUDY

M. BOUNIAS

Laboratory of Biochemistry, INRA and University of Avignon, Domaine St Paul, B.P. 91, F84140 Montfavet, France

(Received 24-12-1987; accepted 22-7-1988)

Summary — Use of the Hill equation in plotting the results of toxicological experiments offers the following advantages:

1. In dose/effect relationships, the maximum response R_M can be accurately determined by means of a described new noniterative algebraic method, from both hyperbolic and sigmoidal responses expressed in natural (nontransformed) units. The Hill coefficient (n) and the dose giving 50% (f_{50}) or X% (f_X) of R_M, as well as their SD, are accurately deduced.

2. In time-course experiments with sigmoidal shape, an additional set of parameters, readily available from the former basic 3, makes it possible to avoid arbitrary choices, such as the time at which a percentage or mortality is considered. The slopes of the tangents at the inflexion point (maximum rate of response) and at half-maximum effect, then the coordinates of these points and the horizontal intercept of the tangent at inflexion point (as an index of initial lag-phase) will give increasing and decreasing functions of doses, respectively, depending on R_M, f_{50}, and (n).

3. The processes described first allow the classical parameters LD_{50} (or LD_X) and LT_{50} (or LT_X: X% lethality time) to be calculated with high algebraic accuracy, in addition to R_M and (n), both of which are of great interest in the general case of ligand-receptor interactions. Thus, the deduced set of additional indexes, not readily available from classical "Probits-type" transformations, eliminates the mortgage of subjective operations.

dose-effect / time-effect plots / Hill equation / toxicology / theoretical toxicological indexes

Introduction

It is no mystery that even in attempts to determine the universally used LD_{50} (which originated with Trevan, 1927) or any effect other than lethality (ED_{50}, and more generally ED_X, *i.e.* dose giving X% of the maximum effect, $0 < X < 100$), a number of difficulties arise from both experimental conditions and appropriate treatment of data (Zbinden and Flury-Roversi, 1981; Chanter and Heywood, 1982). Cumulative dose-effect relationships (see Valette, 1972) as well as time-course-dependent effects (Haverty and Dell, 1984) often exhibit a sigmoidal shape when plotted in natural units. Also, hyperbolic responses may be encountered (Popesković and Bounias, 1986) and changed into sigmoidal ones when expressed *versus* the logarithm of doses. Using

the analogy with the integral form of normal distribution equations, linear transformations of the data were introduced by Finney (1947).

The most popular is the "Probits" method, which can be achieved by using special graph paper (Miller and Tainter, 1944) or tables (Litchfield and Wilcoxon, 1949). Certain variants have been proposed, such as the "logits" (Berkson, 1944) or the "Weibull" one, as reviewed by Christensen and Nylhom (1984).

Such conversions are considered as "reasonably efficient" (Chanter and Heywood, 1982), although they suffer from a number of criticisms (Hamilton *et al.*, 1977). On the other hand, their systematic, routine application, regardless of the actual shape of the response plotted in natural units, may lead to inappropriate changes, such as the conversion of a fairly linear dose-mortality curve into a quasi-sigmoidal one from the Probit transformation, followed by a therefore less valid calculation of the LD_{50} (Volckaert and Van Laere, 1984).

The case of time-effects plots appears in an algebraically similar manner, in cumulative phenomena such as mortality curves, with the need for a good estimation of the asymptotic maximum and then of the time giving X% of this maximum effect, *i.e.* ET_X, which is then, in turn, plotted *versus* doses with interest for the study of acute toxicity (Molinengo, 1979).

The aim of this work is thus to assess the value of an alternative approach, based not on the modification of statistical distributions, but rather on the algebraic description of the more general case of ligand-receptor interactions already used in pharmacology (Limbird, 1987), *i.e.* the Hill equation.

This plot actually accounts for either hyperbolic or sigmoidal responses (in natural units) and can thus be fitted to a large number of practical cases, provided sufficient rigor is respected in calculation of the parameters.

Methods and theoretical background

Basic equations

A pharmacological or toxicological response (R) recorded at various levels of a given factor (f) can be expressed as:

$$R = R_M \cdot f^n / (K + f^n). \quad [1]$$

Assuming f^{50} is the factor level giving half the maximum effect ($R = R_M/2$), f_{50} being therefore expressed in the same units as f, it comes: $K = f^n{}_{50}$, *i.e*

$$R = R_M \cdot f^n / (f^n{}_{50} + f^n). \quad [2]$$

R_M is the asymptotic maximum result, n the Hill coefficient, and f_{50} a constant. By analogy with biochemical and pharmacological processes, which involve various numbers of receptors (nR) interacting with differing numbers of ligands (nL), the Hill coefficient (n) may reflect an approach of the ratio nL/nR (Bounias, 1983), depending on the many interactions that are involved in the final expression of the toxicological effects plotted *versus* doses.

In the case of time-effects plots, (n) allows adequate fitting to the shape of the experimental curves.

The basic 3 parameters can be determined without approximation, using 2 noniterative algebraic methods (Endrenyi, 1975; Bounias, 1978, 1979) from at least 3 values of the response, corresponding to a series of 3 values of f chosen in such a way as $fj = 2 \cdot fi$. A generalized form of the latter can now be proposed, allowing an accurate determination of R_M.

Let (fi, fj) 2 particular series of pairs of values such as $fi \cdot fj = \gamma^2$, a constant number, and Ri, Rj the corresponding responses recorded at fi and fj. Then, plotting $Y = (Ri^{-1} + Rj^{-1})$ *versus* $X = (Ri \cdot Rj)^{-1}$, and observing that $f^n_{50} = (R_M/R_1^{-1})$ with R_1 determined at $f_1 = 1$ unit, R_M is readily obtained as the regression slope of the following equation:

$$Y = R_M \cdot X + R_M^{-1} [1 - (f_{50}/\gamma)^{2n}]. \qquad [4]$$

For each pair (Ri, Rj), one independent value of R_M also infers from the following derived form of equation [4]:

$$R_M (ij) = (2R_\gamma^{-1} - (Ri^{-1} + Rj^{-1}))/(R_\gamma^{-2} - (RiRj)^{-1}). \qquad [4-1]$$

One particular determination of (n) infers from each pair of experimental data (Ri, fi) except ($R1$, $f1$) using the relation:

$$n = Ln[(R_M/R_1^{-1})/(R_M/R_i^{-1})]/Ln\, fi. \qquad [5]$$

Thus, f_{50} may be calculated in 2 ways:

1. Let $R\gamma$ be the response at $f = \gamma$: then, one value of f_{50} infers from each pair Ri, Rj in such a way as:

$$f_{50} = \gamma \cdot [(R_\gamma - Ri)(R_\gamma - Rj)/(RiRj) - R_\gamma^2)]^{1/n}. \qquad [6]$$

2. Let (a) the vertical intercept of the linear regression equation [4]: then f_{50} comes from:

$$f_{50} = \gamma \cdot (1 - a\, R_M)^{1/2n}. \qquad [7]$$

A well known alternative way also allows a valuable determination of (n) and f_{50}, but on the indispensable condition that R_M has been calculated with accuracy, using, for instance, equation [4] or [4-1]. Equation [2] can be rewritten as: $Ri/(R_M - Ri) = f^n_i \cdot f^{-n}_{50}$, *i.e.* in the logarithmic form:

$$Ln\, [Ri/(R_M - Ri)] = n \cdot Ln f_i - n \cdot Ln\, f_{50}. \qquad [8]$$

The regression slope of $Ln\, [Ri/(R_M - Ri)]$ *versus* $Lnfi$ directly gives (n) and the horizontal intercept gives Lnf_{50}, then f_{50}. This method remains of particular interest when R_M has not to be evaluated, as for instance in lethality studies where it can likely be postulated that $R_M = 100\%$.

Statistical assessment of variability of parameters

The above basis of calculation allows the various parameters to be calculated in 4 principal ways:

(a) a series of $N/2$ values, N being the number of (fi, Ri) pairs of data; (b) a linear regression slope; (c) a vertical intercept; (d) a horizontal intercept.

The confidence interval of a regression slope can be estimated by $\pm t\, [(SSDy - SPD^2/SSDx)/$

$(N-2)SSDx]^2$ (Dagnelie, 1986) where SSD = sum of squares of deviates, SPD = sum of products of deviates, and t, the chosen risk. The expression $(SSDy - SPD^2/SSDx)/SSDx$ can be written in the form: $(SSDy/SSDx) - SPD^2/SSD^2x$) *i.e.* $d^2 (1-\rho^2)$ with $d^2 = SSDy/SSDx$ and $\rho^2 = SPD^2/SSDx \cdot SSDy$. Here, d is the slope of the least rectangle line ($d = \sigma y/\sigma x$) and the slope of the least square line is $b = \rho.d$. Then, the SD of b is $\sigma = (b/\rho)^2(1-\rho^2)/(N-2) = | (b/\rho)^2 - b^2 | /(N-2)$.

Table I summarizes the SD that can be deducted for the basic 3 parameters R_M, f_{50}, and n, according to the chosen method of calculation.

Derived toxicological indices

The case of data exhibiting a sigmoidal response in natural units (*i.e.* $n > 1$) appears to be of special interest, since several interesting parameters can be deduced from the previous ones.

1. The tangent slope at the half-maximum effect infers from the first derivation of Eq. [2], that is:

$$R'(f) = n \cdot R_M \cdot f^n_{50} \cdot f^{n-1} / (f^n_{50} + f^n)^2. \qquad [9]$$

Writing $f = f_{50}$ in Eq. [9] finally gives:

$$R'(f_{50}) = n/4 \cdot R_M \cdot f_{50}^{-1}, \qquad [10]$$

which exists whatever the value of n may be. This tangent (noted Δ_{50}) intercepts the vertical and the horizontal axis at the respective points:

$R_{50} = R_M/4 \cdot (2 - n)$, whose value is positive for $n < 2$ and:

$\Delta_{50} = (n-2)/n \cdot f_{50}$, which is positive for $n > 2$.

2. The inflexion point is characterized by the second derivative of Eq. [2], that is:

$$R''(f) = f^{n-2} [n \cdot (n-1) R_M \cdot f^n_{50} \cdot f^{n-2} \cdot (f^n_{50} + f^n) - 2n^2 \cdot R_M f^n_{50} \cdot f^{2n-2}] / (f^n_{50} + f^n)^3. \qquad [11]$$

The coordinates of this point are given by

$R''(f) = 0$, namely:

on the vertical axis: $R_{inf} = R_M/2 \cdot (n-1)/n$ (positive for $n > 1$);

on the horizontal axis: $f_{inf} = f_{50} \cdot [(n-1)/(n+1)]^{1/n}$ (positive for $n > 1$).

Table I. Assessment of the variability of the basic 3 parameters, according to the various described methods.

Method of calculation	SD	Calculable parameters
Series of determinations	$\sigma = (SSD/f-1)^{1/2}$	R_M, f_{50}, n
Regression slope (b)	$\sigma_b = (b/\rho)^2(1-\rho^2)/(N-2)$	R_M, n
Vertical intercept (a)	$\sigma_a = \sigma b.x$	f_{50}
Horizontal intercept ($-a/b$)	$\sigma(-a/b) = \frac{v}{b} \left[\frac{\pm \sigma_b}{b \pm \sigma_b} \right]$	f_{50}

Total available determinations: for R_M, $f \geq N/2$; for n: $f = N$; for f_{50}: $N = N/2 + 2$. ρ = correlation coefficient; $\bar{x}$, $\bar{y}$ = average values on the horizontal and vertical axes.

The slope of the tangent at the inflexion point (noted Δ_{inf}).

$$R'(f_{inf}) = R_M/4 \cdot f_{50}^{-1} \cdot n^{-1}[(n-1)^{n-1} \cdot (n+1)^{n+1}]^{1/n}. \quad [12]$$

This tangent intercepts the vertical and the horizontal axes at the respective points:
$R\Delta_{inf} = -R_M/4 \cdot (n-1)^2/n$ always negative and:
$f\Delta_{inf} = f_{50} \cdot [(n-1)/(n+1)]^{(n+1)/n}$ always positive for $n > 1$.

3. General features of tangents at origin. Eq. (9) allows the slopes of the tangents at origin to be distinguished in the 3 major cases, still considered in natural units: for $n = 1 = R'(f) = R_M/f_{50}$, (maximum rate of the response); for $n < 1$: $R'(f) \rightarrow \infty$, *i.e.* the tangent is the vertical axis; for $n > 1$: $R'(f) = 0$, *i.e.* the tangent is the horizontal axis. Fig. 1 illustrates the various expected configurations.

4. Lethal doses other than LD_{50}.

In some cases, it may be of interest to consider the dose giving X% mortality (LD_x), such as the LD_2 (x = 2%) used for the calculation of safety indices (Atkins *et al.*, 1981) in honeybee toxicology. Again, in this case, the proposed model readily allows the direct calculation of any such parameters, from the previously determined LD_{50} (f_{50}) and R_M values, by means of the following relation:

$$LDx = LD_{50}\ (x/(R_M - x))^{1/n}. \quad [13]$$

Results and Discussion

1. Estimation of LD_{50}

The 3 available basic parameters offer a wide range of possibilities of fitting to experimental data. In cases where very weak mortalities are observed up to a given dose (d), a calculated high value of (n) may simply account for the observed shape of the curve, as shown in Fig. 1D.

When no mortality at all can be observed at low doses, the highest disposable value '*do*' with Ro = 0 is taken as the new origin and the calculations are run with the change: Di = *di* − *do*.

As an example, Fig. 2 illustrates the Hill characteristics of the well known pioneer dose/mortality curve obtained by Finney after injection of mice with cocaine, and presented as a classical case in pharmacodynamics textbooks (Valette, 1972). Here, the Miller-Tainter graphical Probits method and the complete Bliss method (involving no fewer than 6 intermediate steps) gave LD_{50} = 24.5 and 25.0 µg cocaine, respectively. On the basis of the Hill equation, with Ro = 0 for *fo* = 15 µg, the available 3 appropriate points gave R_M = 95.1% using Eq. [4−1]. Then, relation [8] gave n = 2,70 (σn = 0.13) and LD_{50} = 9.05 + 15 = 24.05 µg (σ = ± 1.00 µg). Using R_M = 100% would have given n = 2.48 (σn = 0.14) and LD_{50} = 24.6 µg (σ = ± 1.01 µg), *i.e.* an intermediate value between those of the Probits origins: this first means that the Hill equation may very well compete with the Probits methods for determination of the LD_{50}. But, in addition, the proposed method easily allows an accurate previous determination of the asymptotic limit which, in theory, can never

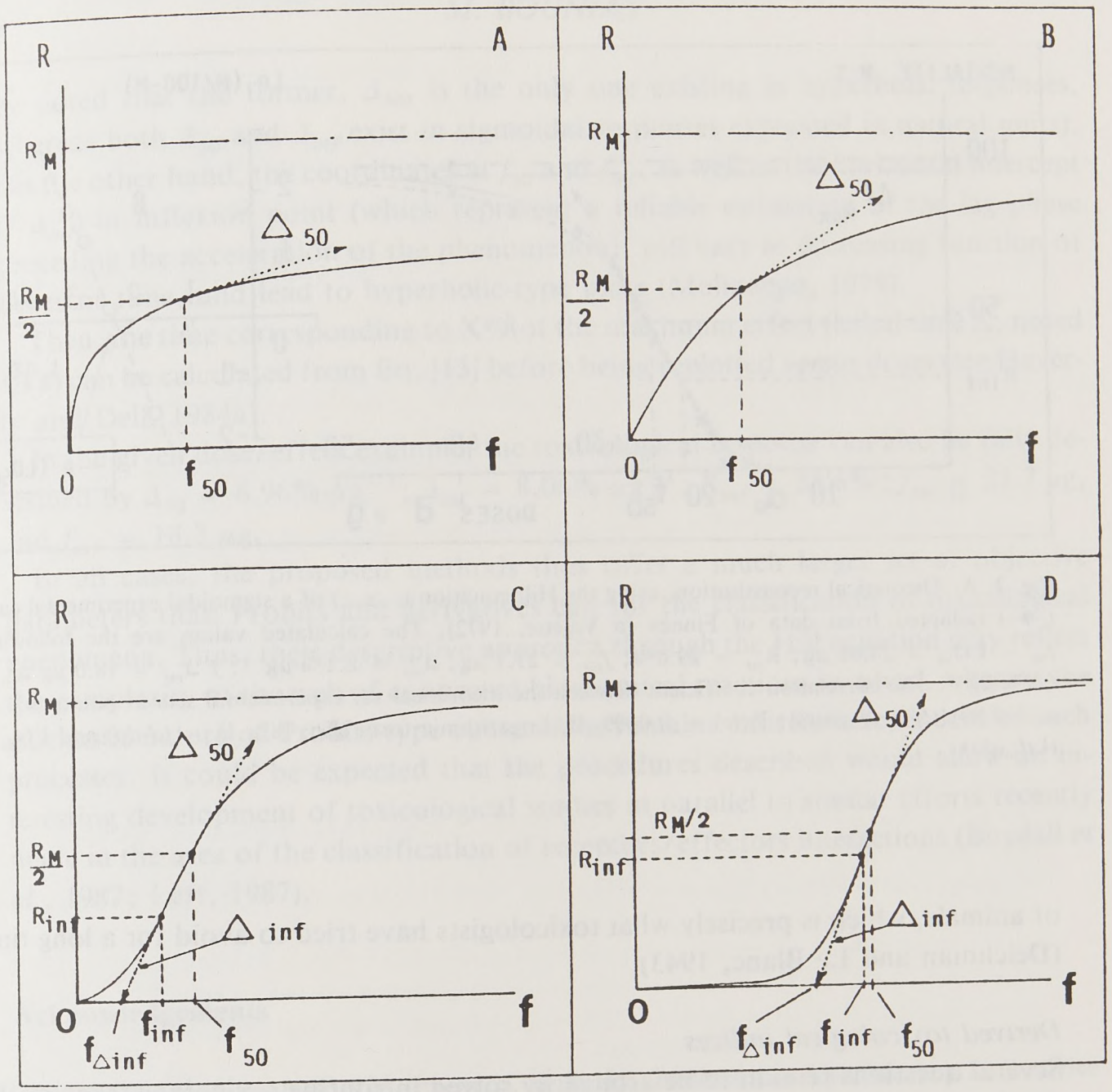


Fig. 1. The various aspects of theoretical dose (or time)/effect relations verifying the Hill equation. **A–C**, 3 typical configurations corresponding to $n<1 \cdot n = 1 \cdot n>1$ resp., with R_M and f_{50} remaining unchanged. D, increase of the values of n here to $n = 7.5$ and of f_{50} here to $f_{50} = 8$ accounts for another shape, involving a lag-phase before acceleration of the phenomenon. *Dotted arrows* indicate the tangents at half-maximum effect point (f_{50}, $R_M/2$) and at inflexion point (f_{inf}, R_{inf}). The latter only exists when $n>1$ and its horizontal intercept is f Δ_{inf}. Algebraic values of all these parameters are given in the text.

be estimated through a graphical way (Naqui, 1986), and of the coefficient (n) reflecting a putative balance number of ligands per receptor unit, in the various molecular interactions involved in the whole toxicological process.

Eq. [4] to [7] thus appear to be of interest not only in toxicology but also in general pharmacology. In the example cited here, the R_M value is slightly lower than 100%, which could hardly be experimentally determined, except by using a very large number

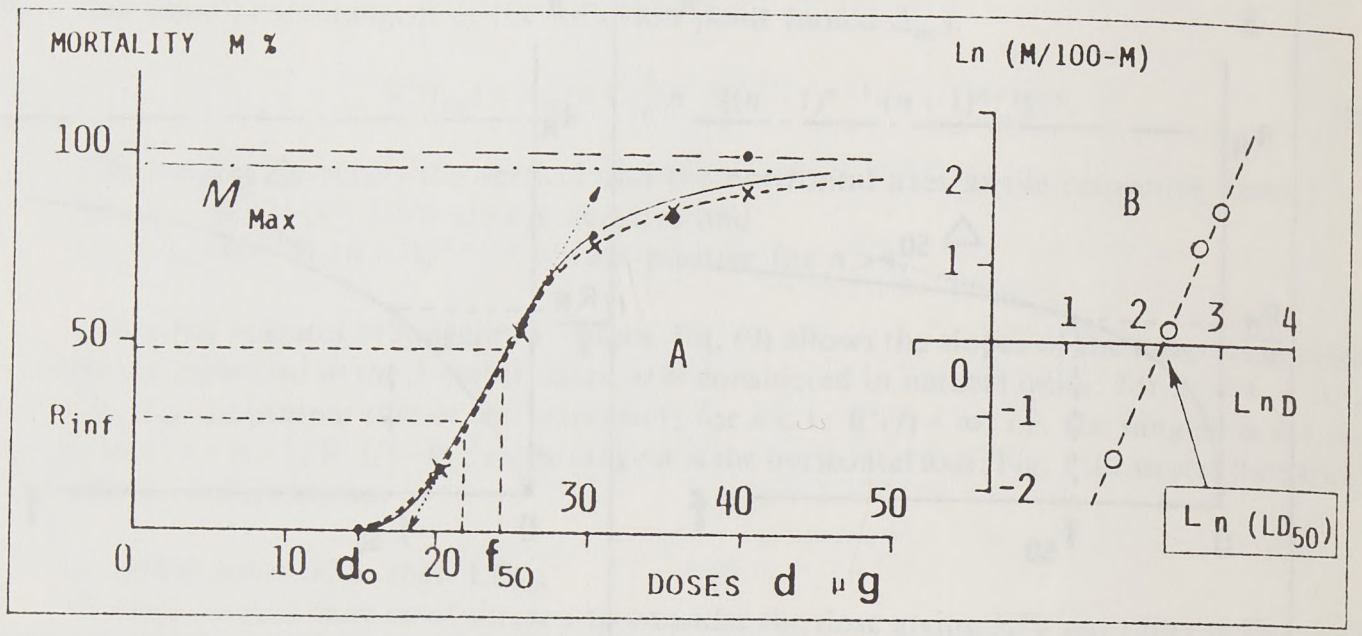


Fig. 2. A, Theoretical reconstitution, using the Hill equation (...x...) of a sigmoidal experimental curve (–●–) (adapted from data of Finney in Valette, 1972). The calculated values are the following: f_{50} = LD_{50} = 24.05 µg; R_{inf} = 29.6%; f_{inf} = 21.7 µg; Δ_{inf} = 8.1%·µg^{-1}; $f\Delta_{inf}$ = 18.0 µg Δ_{50} = 6.9%·µg^{-1}. The correlation coefficient between the theoretical *vs.* experimental sets of points is: ρ = 0.991 (N = 5 pairs); P/(ρ) = 0.0009. B, Logarithmic form (Eq. [8]). D = (d-do) and LD_{50} = (Ld_{50}-do).

of animals, which is precisely what toxicologists have tried to avoid for a long time (Deichman and Le Blanc, 1943).

Derived toxicological indices

Several questions remain to be arbitrarily solved in routine toxicology, such as the time at which a given percentage of mortality should be considered. Thus, the shape of dose-effect responses essentially depends on the choice of this time, and therefore appears as subjective. Moreover, in experiments concerning short-lived animals, such as insects, it happens that the controls reach their limit of life, *i.e.* near 100% mortality within the duration of the treatment.

For all these reasons, it seemed of major interest to characterize the phenomena by a set of objective parameters describing the properties of the full responses, and allowing fully objective comparisons.

Inferring from the 3 basic parameters of the Hill equation, the tangent (Δ_{50}) at the half-maximum response point (f_{50}: R_{50}), the inflexion point (f_{inf}: R_{inf}), then the tangent at this point (Δ_{inf}) and its horizontal intercept ($f\Delta^{inf}$) give a set of an additional 5 objective values. Any of which can then be replotted *versus* the corresponding doses.

Accordingly, it can be very probably expected that the slopes Δ_{50} and Δ_{inf}, which represent the rate of the phenomenon at half-maximum and the maximum rate, respectively, will generally vary rather as increasing functions of doses (it should

be noted that the former, Δ_{50}, is the only one existing in hyperbolic responses, whereas both Δ_{50} and Δ_{inf} exist in sigmoidal responses expressed in natural units). On the other hand, the coordinates at f_{50} and f_{inf}, as well as the horizontal intercept ($f\,\Delta_{inf}$) at inflexion point (which represent a reliable estimation of the lag phase preceding the acceleration of the phenomenon), will vary as decreasing function of doses or time, and lead to hyperbolic-type plots (Molinengo, 1979).

Then, the time corresponding to X% of the maximum effect (lethal time X, noted LTx) can be calculated from Eq. [13] before being replotted *versus* doses (see Haverty and Dell, 1984a).

In the given dose/effect example, the toxicological response can also be fully described by $\Delta_{50} = 6.96\%\cdot\mu g^{-1}$; $\Delta_{inf} = 8.06\%\cdot\mu g^{-1}$; $R_{inf} = 23.6\%$; $f_{inf} = 21.7\ \mu g$, and $f_{inf} = 18.3\ \mu g$.

In all cases, the proposed methods thus offer a much larger set of objective parameters than Probits and derivatives can for the classification of toxicological phenomena. Thus, their descriptive approach through the Hill equation may reflect the complexity of the web of connected biochemical reactions involved, whereas the stochastic nature of Probits-type conversions remains entirely independent of such processes. It could be expected that the procedures described would allow an interesting development of toxicological studies in parallel to similar efforts recently made in the area of the classification of receptors/effectors interactions (Birsdall *et al.*, 1987; Leff, 1987).

Acknowledgements

Thanks are due to Professors M. Pachéco, M.M. Loubatières and Alric for their kind advice and information, and to Miss D. Fernandez for her expert typing of the manuscript.

References

Atkins E.L. (1975) Toxicity of pesticides and other agricultural chemicals to honey bees. *Univ. Calif. Div. Agric. Sci.* Leaf, 2287

Berkson J. (1984) Minimum χ^2 and maximum likelihood solution in terms of a linear transformation with particular reference to bioassay. *J. Am. Stat. Assoc.* 41, 70–74

Birdsall N.J.M., Hulme E.C., Keen M., Stockton J.M., Pedder C. & Wheatley M. (1987) Can complex binding phenomena be resolved to provide a safe basis for receptor classification? In: *Perspectives in Receptor Classification.* Vol. 6 (Black J.W., Jenkinson D.M. and Gerskowitch V.P., eds.), pp. 61–69

Bounias M. (1978) Determination des propriétés cinétiques d'une phosphatase alcaline de l'intestin d'abeilles au moyen d'une nouvelle méthode algébrique rigoureuse. *C.R. Soc. Biol.* 172, 855–859

Bounias M. (1979) Variations in the Hill parameters of haemolymph α glucosidase kinetics as compared by new algebraic methods at three nymphal stages of workerbees (*Apis mellifica, mellifica L.*). *Comp. Biochem. Physiol.* 63 B, 407–417

Bounias M. (1983) Une interprétation stoechiométrique de la signification du coefficient de Hill de certaines enzymes de cinétiques coopératives. *C.R. Acad. Sci. (Paris) Ser. III* 297, 583–588

Chanter D.O. & Heywood R. (1982) The LD_{50} test: some considerations of precision. *Toxicol. Lett.* 10, 303–307

Christensen E.K. & Nyholm N. (1984) Ecotoxicological assays with algae: Weibull dose-response curves. *Environ. Sci. Technol.* 18, 713–718

Dagnelie P. (1984) Les methodes relatives à la régression. In: *Théorie et Méthodes Statistiques* (Presses Agronomiques de Gembloux, Belgique) vol. 2, 267–270

Deichmann W.B. & Le Blanc T.J. (1943) Determination of the approximate lethal dose with about six animals. *J. Industrial Hygiene Toxicol.* 25, 415–417

Endrenyi L., Fajszi C. & Kwong F.H.F. (1975) Evaluation of Hill slopes and Hill coefficients when the saturation binding or velocity is not known. *Eur. J. Biochem.* 51, 317–328

Finney D.J. (1947) *Probit Analysis: A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve.* London, Cambridge University Press.

Hamilton M.A., Russo R.C. & Thurston R.V. (1977) Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11, 714–719

Haverty M.I. & Dell T.R. (1984) Time trends in mortality of *Conophthorus ponderosae* (Hopkins) exposed to insecticide residues. *Pestic. Sci.* 15, 369–374

Leff P. (1987) Can operational models of agonism provide a framework for classifying hormone receptors? In: *Perspectives in Receptor Classification.* Vol. 6 (Black J.W., Jenkinson D.M. and Gerskowitch V.P., eds.) pp. 157–167

Limbird L.E. (1987) In: *Cell Surface Receptors: a Short Course on Theory and Methods.* (Martinus Nijhof Publ., Boston/Dordrecht/Lancaster) pp. 79–82

Litchfield J.T. & Wilcoxon F. (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Theor.* 96, 99–113

Miller L.C. & Tainter M.L. (1944) Estimation of the ED_{50} and its error by means of logarithmic probit graph paper. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 57, 261–264

Molinengo L. (1979) The curve doses vs survival time in the evaluation of acute toxicity. *J. Pharm. Pharmacol.* 31, 343–344

Naqui A. (1986) Where are the asymptotes of Michaelis-Menten? *Trends Biochem. Sci.* 11, 64–65

Popesković D. & Bounias M. (1986) Le blocage du fonctionnement des hémocyanines de l'acarien *Varroa jacobsoni* comme base physiologique spécifique d'un traitement par voie systémique de la varroatose de l'abeille. *C.R. Soc. Biol.* 180, 662–668

Trevan J.W. (1927) The error of determination of toxicity. *Proc. R. Soc.* 101B, 483–514

Valette C. (1972) In: *Précis de Pharmacodynamie.* 2e ed., Masson Ed., pp. 87–89

Volckaert M. & Van Laere O. (1984) Toxicity of an MCPP/2,4-D mixture for the larva stage of the honeybee (Apis mellifera L.). *Med. Fac. landbouww. Rijksuniv. Gent* 49, 751–757

Zbinden G. & Flury-Roversi M. (1981) Significance of the LD_{50} test for the toxicological evaluation of chemical substances. *Arch. Toxicol.* 47, 77–99

B - Thanatologie des larves d'Abeilles.

La Collaboration officielle Franco-Yougoslave amorcée en 1980 s'est matérialisée cette année par la publication des résultats d'étude de la stabilité de la lipémie dans les larves d'abeilles du 5e stade conservées in vitro.

Ce travail constitue une base pour de futures études sur l'action de toxiques susceptibles d'affecter les lipides, comme les pyréthroïdes, par exemple.

Il se poursuivra, au cours de 1989, avec l'équivalent au niveau de la glycémie et des α-glucosidases.

Ces recherches entrent dans le cadre de la thèse (préparée au LBC pour toute la partie biochimique) que devrait soutenir Mme Debevec à Belgrade fin 1989 ou début 1990.

Société de Biologie de Montpellier Séance du 3 novembre 1988

C. R. Soc. Biol., 1988, *182*, 479-486.

Biochimie comparée.

Manifestations homéostasiques et thanatologiques de la lipémie des larves d'abeilles du 5e stade conservées hors de leurs alvéoles

par MICHEL BOUNIAS, MIRJANA DEBEVEC * et D. POPESKOVIC *

Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, B. P. 91, 84140 Montfavet, France.
** Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Belgrade, Département de Biologie, Bul. JENA 18, P. O. Box 370, 11000 Belgrade, Yougoslavie.*

(*reçue le 14 novembre 1988*).

Summary. — Fifth instar honeybees larvae extracted from their alveoli were kept in glass dishes during 6 hrs at 20° C or 6 days at 7° C. In such conditions the morphology of the larvae stops evolving towards nymphosis and the agony symptoms appear after 6 hrs at 20° C and from 5 days at 7° C. Among the haemolymph lipid classes, phospholipids, steroids and diacyl 1-3 glycerols remain stable during 6 hrs at 20° C or 4 days at 7° C. Beyong this limit, fatty acids, 1-2 diacylglycerols and triacylglycerols increase whereas 1-3 diacylglycerols and steroid esters decrease: these variations are respectively consistent, in the first case with the increases that should have marked the beginning of nymphosis, and in the second with symptoms specifically observed in agonizing larvae.

Résumé. — Des larves d'abeilles du 5e stade extraites des alvéoles ont été conservées en récipients de verre pendant 6 h à 20° C et pendant 6 jours à 7° C. Dans ces conditions, la morphologie des larves cesse d'évoluer vers la nymphose et les symptômes d'agonie apparaissent à partir de 6 h à 20° C et au 5e jour à 7° C. Parmi les classes de lipides extraites de l'hémolymphe, les phospholipides, les stéroïdes et les diglycérides 1-3 montrent des concentrations stables pendant 6 h à 20° C ou 4 jours à 7° C. Au delà de cette limite, les teneurs des acides gras des diglycérides 1-2 et des triglycérides augmentent, tandis que celles des diglycérides 1-3 et des esters de stéroïdes diminuent : ces variations concordent, respectivement, dans le premier cas, avec celles qui auraient dû accompagner le début de la nymphose et, dans le second cas, avec les symptômes spécifiquement observés sur les larves à l'agonie.

L'utilisation massive de nombreuses classes de pesticides expose l'abeille à récolter une large gamme de substances xénobiotiques imprégnant les pollens et les nectars qu'elle ramène et emmagasine dans la ruche (1, 2). A l'action directe de ces produits sur les butineuses pendant leur travail de pollinisation (3), il s'ajoute donc les risques supplémentaires encourus par le couvain. En effet, d'une part les larves sont nourries du 1er au 4e stade, ce qui entraîne la possibilité d'ingestion de substances toxiques (4), d'autre part, les alvéoles contenant les jeunes larves restent ouverts jusqu'à la fin du 5e stade, au moment où la larve se dispose longitudinalement pour commencer la nymphose : ceci les rend vulnérables par contact et inhalation et davantage, encore, depuis que l'infestation des ruches par l'Acarien *Varroa jacobsoni* a entraîné l'emploi, à l'intérieur même des ruches, de pesticides parmi lesquels figurent des formamidines, des pyréthroïdes et des organo-phosphorés.

Il est, par ailleurs, important de souligner que des molécules autres qu'insecticides, par exemple, des herbicides, peuvent se montrer toxiques vis-à-vis de l'abeille (5). Les recherches toxicologiques sur les larves ont été assez peu nombreuses jusqu'ici, en raison des difficultés liées à leur fragilité ainsi qu'aux aléas de la prise de nourriture en des conditions artificielles. Toutefois, diverses expérimentations ont fait apparaître ainsi la toxicité d'insecticides (6) et d'herbicides (7) administrés aux jeunes larves *per os*.

Le but de nos recherches est de caractériser la stabilité de quelques paramètres biochimiques des larves du 5e stade, lorsque celles-ci sont conservées hors de leurs alvéoles, de manière à permettre ultérieurement l'application de pesticides par voie topique ou par inhalation, et d'en mettre en évidence les effets spécifiques. Dans une première étape, ce procédé éviterait le facteur supplémentaire de variabilité lié à l'ingestion, qui reste difficile à contrôler. En raison des connaissances antérieurement acquises sur les variations naturelles de la lipémie au cours du développement de l'abeille (8), nous avons étudié, en premier lieu, l'évolution de la concentration des principales classes de lipides dans des larves du 5e stade conservées dans des récipients de verre à diverses températures, jusqu'à ce qu'apparaissent les symptômes d'agonie.

Animaux et techniques. — Les larves ont été extraites des alvéoles à l'aide de pinces souples et intoduites par groupes de 5 dans des boîtes de Petri en verre de 5 cm de diamètre. Leur poids moyen individuel était de 128, 6 $\pm$ 9,6 mg. Un premier lot a été placé à 20° C et un second à 7° C. Les prélèvements d'hémolymphe ont été effectués dans les deux lots au bout de 1 heure, 3 heures et 6 heures et, dans le second lot (7° C) au bout de 1 jour, 2 jours, 4 jours, 5 jours et 6 jours. Les prélèvements, effectués à l'aide de microseringues Hamilton, permettent d'obtenir en moyenne 26,0 $\pm$ 3,9 µl par larve. Les lipides sont extraits au chloroforme, chromatographiés sur couche mince de gel de silice et dosés par densitométrie au moyen des techniques précédemment décrites (8, 9).

Pour chaque traitement, deux mesures indépendantes ont été effectuées à partir d'un échantillon de 5 larves. Les probabilités associées aux comparaisons de moyennes ont été calculées d'après l'équation de distribution de t de Student, à partir des données originales non arrondies.

Les lipides sont désignés par les abréviations suivantes : PL = phospholipides; St : stéroïdes; ESt : esters de stéroïdes; AG = acides gras; MG = monoglycérides; DG 1-2, 1-3 = diglycérides 1-2 et 1-3; TG = triglycérides.

Résultats. — A. OBSERVATION DES SYMPTÔMES D'AGONIE. — La Figure 1 présente les stades successifs observés, soit dès le premier jour, à température supérieure ou égale à 20° C, soit à partir du 5e jour, lorsque les larves sont placées à 7° C. Le premier stade (AGN 1) se caractérise

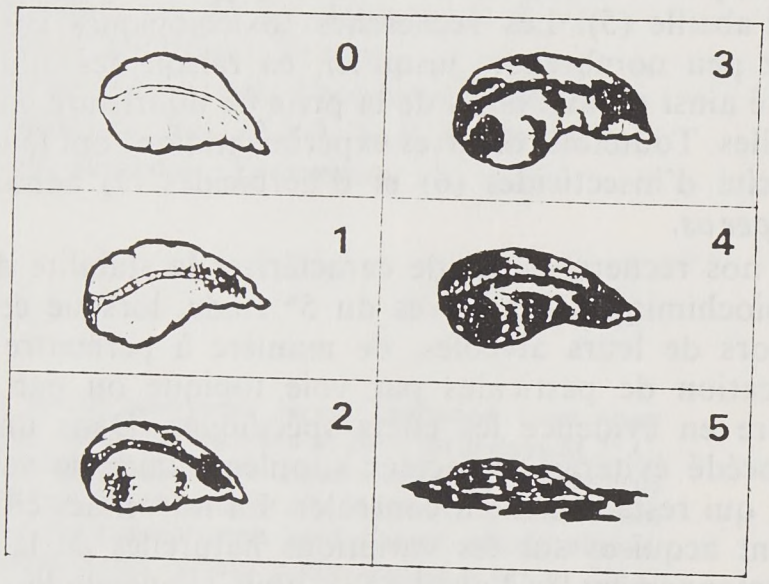


FIG. 1. — Symptômes d'agonie des larves d'abeilles du 5e stade. 0 = aspect originel; 1 à 4 = stades successifs d'agonie; 5 = stade ultime (lyse cellulaire et mort).

par un léger brunissement de l'hémolymphe, ainsi que de la région thoracique. Au second stade (AGN 2), le brunissement s'accentue et de nouvelles zones apparaissent dans la région abdominale. Au 3e stade, (AGN 3), l'hémolymphe ainsi que les plaques précédentes sont très foncées et de nouvelles zones de brunissement se développent, encore séparées par des régions claires. Au 4e stade (AGN 4), le brunissement s'étend à toutes les zones restées blanches, la larve conservant sa forme primitive. Le 5e stade est celui de la mort, accompagnée d'une lyse cellulaire avec un affaissement complet des tissus doublé d'hémorragies en phase terminale. Les stades 1 et 2 interviennent dès le 5e jour à 7° C et les stades 3, 4 et 5 au 6e jour.

B. LIPÉMIE DES LARVES CONSERVÉES A 20° C. — Les variations les plus significatives affectent les diglycérides 1-2 et les triglycérides puis les acides gras et, à un moindre degré, les monoglycérides, au bout de

3 heures. La variabilité observée est très importante dans ces divers cas et altère parfois la signification des comparaisons. En revanche les autres paramètres, ainsi que leur variabilité, restent stables.

C. Lipémie des larves conservées a 7° C. — Les tableaux II et III présentent respectivement les classes les plus concentrées et celles qui

Tableau I. — Évolution de la lipémie (mM) chez les larves d'abeilles du 5e stade conservées à 20° C.

Lipides	Témoins	1 heure	3 heures	6 heures
PL	3,0 (0,8)	4,4 (0,2)	ND	3,9 (0,1)
St	1,0 (0,1)	1,7 (0,1)	0,9 (0,5)	1,5 (0,02)
ESt	0,41 (0,30)	0,69 (0,12)	0,29 (0,11)	0,34 (0,02)
AG	0,15 (0,05)	0.56 (0,31)	0,29 (0,21)	1,00 (0,45)
				P = 0,14
MG	0,15 (0,05)	0,52 (0,16)	0,27 (0,08)	0,52 (0,16)
		P = 0,13		P = 0,13
DG 1-2	0,002 (0,001)	0,018 (0,004)	0,010 (0,002)	0,010 (0,002)
		P = 0,045	P = 0,05	P = 0,05
DG 1-3	0,13 (0,01)	0,16 (0,01)	0,13 (0,02)	0,12 (0,01)
TG	0,26 (0,03)	3,91 (0,72)	0,82 (0,45)	9,81 (2,74)
		P = 0,02		P = 0,04

Les écarts-types sont indiqués entre parenthèses et les seuils de signification des comparaisons avec les valeurs initiales (témoins) sont désignés par « P ».

ND = non dosé par suite d'artefacts.

Tableau II. — Évolution des 4 fractions les plus concentrées de la lipémie (mM) chez les larves d'abeilles du 5e stade conservées à 7° C.

Heures	PL	St	ESt	TG
1	3,86 (1,01)	1,53 (0,37)	0,51 (0,27)	3,47 (1,52)
				P = 0,10
3		0,80 (0,03)	0,28 (0,01)	2,31 (0,38)
				P = 0,0020
6	4,01 (0,15)	1,13 (0,01)	0,34 (0,02)	2,04 (0,43)
				P = 0,032
24	2,29 (0,60)	0,32 (0,19)	0,01 (0,004)	0,04 (0,03)
		P = 0,09		P = 0,034
48	3,35 (0,15)	1,50 (0,27)	0,02 (0,01)	4,69 (1,24)
				P = 0,04
96	3,41 (0,03)	0,88 (0,55)	0,76 (0,30)	8,75 (0,08)
				P = $2,3.10^{-3}$
120	2,40 (0,19)	0,24 (0,16)	0,03 (0,01)	5,52 (1,41)
		P = 0,06		P = 0,035

Les écarts-types sont indiqués entre parenthèses et les seuils de signification des comparaisons avec les valeurs initiales (témoins) figurées dans le tableau I, sont désignés par P.

TABLEAU III. — Évolution des 4 fractions mineures de la lipémie (mM) chez les larves d'abeilles du 5e stade conservées à 7° C.

Heures	AG	MG	DG 1-2	DG 1-3
1	0,18 (0,09)	0,08 (0,03)	0,002 (0,0004)	0,15 (0,03)
3	0,19 (0,01)	0,21 (0,06)	0,008 (0,002)	0,09 (0,01)
6	0,35 (0,14)	0,14 (0,04)	0,010 (0,002) P = 0,05	0,12 (0,01)
24	0,33 (0,26)	0,08 (0,02)	0,017 (0,003) P = 0,026	0,08 (0,06)
48	0,46 (0,45)	0,30 (0,09)	0,04 (0,01) P = 0,036	0,14 (0,01)
96	0,36 (0,35)	0,07 (0,02)	0,03 (0,003) P = 0,009	0,04 (0,02) P = 0,04
120	0,50 (0,50)	0,00 (...) P = 0,05	0,06 (0,02) P = 0,06	0,03 (0,003) P = 0,008

Les écarts-types sont indiqués entre parenthèses et les seuils de signification des comparaisons avec les valeurs initiales (témoins) figurées dans le tableau I, sont désignés par P.

le sont le moins. Les phospholipides et les esters de stéroïdes ne sont pas affectés. La fraction des stéroïdes présente deux diminutions faiblement significatives au bout de 24 heures et 120 heures tandis que celle des triglycérides est fortement augmentée partout, sauf à 24 heures où une chute est observée. Parmi les fractions mineures, les acides gras ne subissent aucun changement significatif, de même que les monoglycérides qui, cependant, disparaissent au bout de 5 jours. Les diglycérides 1-3 sont abaissés au 4e et au 5e jour, tandis que les diglycérides 1-2 sont constamment augmentés à partir de 6 heures.

D. LIPÉMIE DES LARVES A L'AGONIE. — La Figure 2 présente les résultats obtenus chez des larves prises respectivement aux stades 1 (5e jour) et 2 (6e jour). Aucune variation significative n'est observée pour les phospholipides, les stéroïdes libres et les esters de stéroïdes aux deux stades étudiés. Au premier stade, une diminution des diglycérides 1-3 est observée ($P = 0,007$) ainsi qu'une augmentation des diglycérides 1-2 ($P = 0,01$) et des triglycérides ($P = 0,03$). Au troisième stade, les acides gras libres ($P = 0,02$), les diglycérides 1-2 ($P = 0,03$) et les triglycérides ($P = 0,01$) sont fortement accumulés.

Discussion et conclusions. — Le sens des variations de la lipémie des larves d'abeilles conservées hors de leur milieu naturel peut être a conséquence de plusieurs mécanismes possibles. En premier lieu, une évolution physiologique vers les stades suivants (larve mûre et nymphe) peut se manifester et, dans ce cas, il serait normal d'observer,

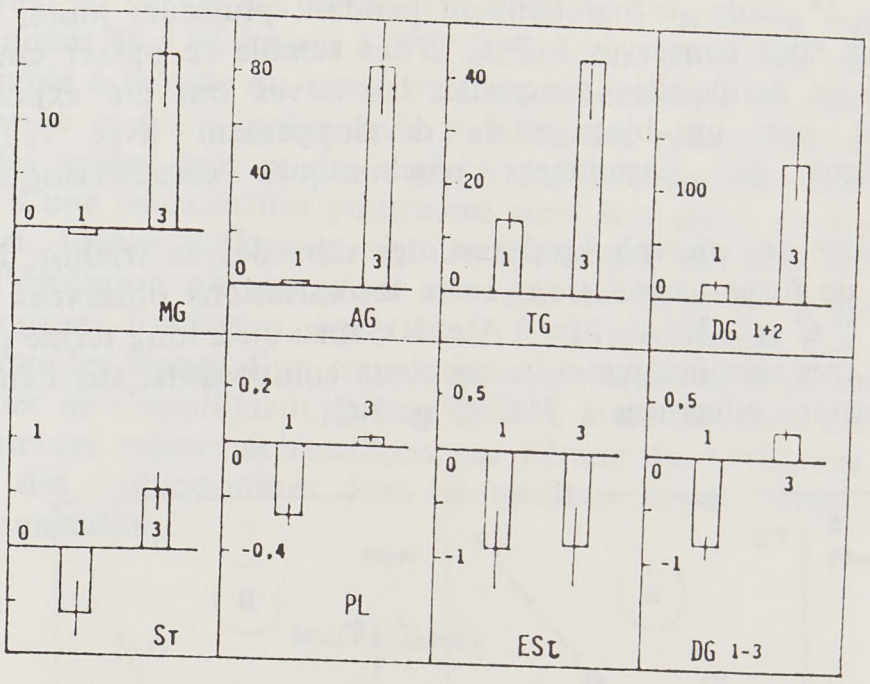


FIG. 2. — Variations relatives [(C − Co)/Co] des principaux composants de la lipémie (C) par rapport aux valeurs initiales (Co), aux premier et troisième stade caractéristiques de l'agonie des larves. Les écarts-types sont figurés par des barres verticales.

comme cela a été précédemment mis en évidence (8), une augmentation significative de tous les composants lipidiques, moins marquée, toutefois, pour les acides gras. Cette évolution entraîne généralement un maximum des concentrations vers le milieu du stade nymphal, ce qui correspond à la durée de conservation des larves L5 avant l'apparition des symptômes d'agonie.

Chez les larves conservées 6 heures à 20° C, les seules variations observées (AG, MG, DG 1-2, TG) concordent avec une telle hypothèse. Chez les larves conservées pendant 5 jours à 7° C, les stéroïdes et leurs esters, ainsi que les monoglycérides et les diglycérides 1-3, montrent en revanche une tendance opposée.

La seconde éventualité nous conduit à examiner ces mêmes résultats par comparaison avec les stades d'agonie : il apparaît alors que les stéroïdes et leurs esters, ainsi que les diglycérides 1-3 tendent également à diminuer, en particulier au 5e jour, c'est-à-dire après un délai suffisant pour que les symptômes d'agonie commencent à être décelables.

Il paraît donc permis de formuler l'hypothèse que les diminutions des concentrations en monoglycérides, diglycérides 1-3, stéroïdes et esters de stéroïdes observées au 5e jour chez des larves présentant encore un aspect normal, pourraient constituer les premiers symptômes biochimiques d'une évolution thanatologique. Les autres variations observées peuvent refléter simplement quelques indices liés à une faible amorce de développement, tandis que la stabilité générale des autres paramètres biochimiques et de la morphologie des larves, montre que les caractères

propres au 5e stade se maintiennent pendant plusieurs jours, lorsque les animaux sont conservés à 7° C. Tout semble se passer comme si les conditions artificielles auxquelles les larves ont été exposées se traduisaient par un blocage du développement avec régulation homéostasique des paramètres biochimiques caractéristiques du stade L5.

La stabilité des phospholipides et des stéroïdes se traduit, à court terme, par de fortes corrélations entre les variations observées respectivement à 7° C et à 20° C (Fig. 3 A et B), ainsi qu'à long terme par une corrélation très significative entre ces deux composants, sur l'ensemble des observations effectuées à 7° C (Fig. 3 C).

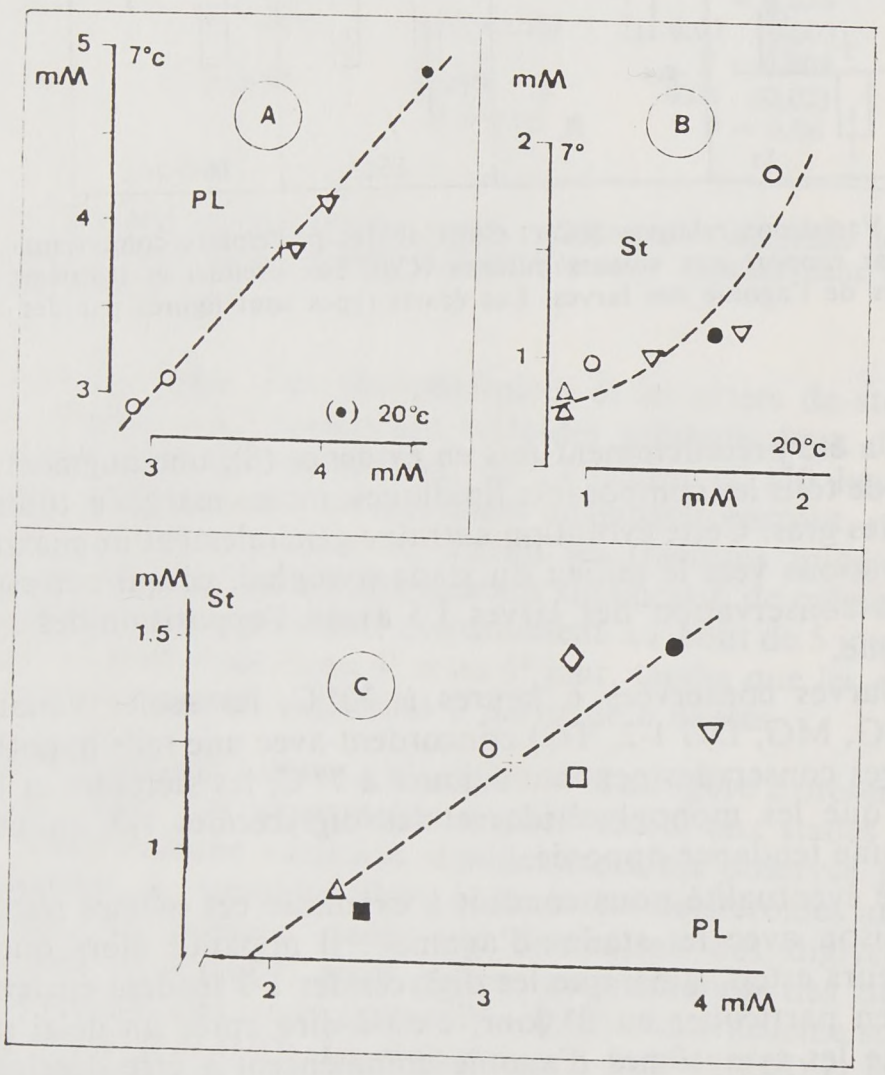


FIG. 3. — Relations entre les concentrations observées respectivement à 7° C et à 20° C pour les phospholipides (A) et pour les stéroïdes (B), ainsi qu'à 7° C entre les stéroïdes et les phospholipides (C). Les paramètres sont les suivants :

(A) $N = 5$; $\rho = 0{,}999$ ($P < 0{,}001$); $d = 1{,}16$ ($\sigma_d = 0{,}03$)
(B) $N = 7$; $\rho = 0{,}808$ ($P = 0{,}03$) ; $d = 0{,}96$ ($\sigma_d = 0{,}31$)
(C) $N = 7$; $\rho = 0{,}842$ ($P = 0{,}02$) ; $d = 0{,}77$ ($\sigma_d = 0{,}22$)

○ = T_0; ● = 1 h; ▽ = 6 h; △ = 24 h; ◇ = 48 h; □ = 96 h; ■ = 120 h.

Le maintien en survie des larves d'abeilles du 5e stade en récipients de verre pendant 48 à 96 heures à 7° C paraît donc constituer une technique favorable à l'étude du mode d'action biochimique de substances toxiques sur le couvain, grâce à la stabilité des phospholipides, des stéroïdes, des acides gras et des diglycérides 1-3, dont les déviations sous l'effet d'une intoxication pourraient ainsi être mises en évidence. D'autre part, toutes variations significatives dans un sens contraire à celui de l'évolution physiologique qui tend normalement à accroître les concentrations lipidiques, après le 5e stade, pourraient être interprétées comme les signes d'un traumatisme moléculaire. Bien entendu, ces remarques ne s'appliquent qu'aux lipides, et ce travail a été complété à partir des mêmes échantillons par l'étude des variations de la glycémie et des α-glucosidases dont les résultats feront l'objet d'une autre communication.

Bibliographie

1. Nasarov C. C., *Bulletin Apicole*, 1969, *12*, 159-161.
2. Johansen C. A., *Ann. Rev. Entomol.*, 1977, *22*, 177-192.
3. Doull K. M., *The Australian Beekeeper*, 1969, *71*, 115-122.
4. Chauvin R., *Ann. Abeille*, 1960, *3*, 5-39.
5. King C. C., *Cleanings in Bee Culture*, 1964, *4*, 230-233.
6. Wittman D., *Z. Angew. Entomol.*, 1981, *92*, 165-172.
7. Wolckaert M. & Van Laere O., *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.*, 1984, *49*, 751-757.
8. Bounias M., Debevec M. & Popeskovic D., *Acta Veterinaria Beograd*, 1985, *35*, 273-282.
9. Bounias M., L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince. Masson, 1983, 205 p.

C - Toxicologie de l'action de la toxine du B.T.i chez le Moustique.

a - L'action de la toxine au niveau de certains amino-acides a fait l'objet d'une publication.

b - Utilisation des relations fonctionnelles entre paramètres biochimiques comme critères de toxicologie "fine".

La mise en évidence de relations fonctionnelles entre amino-acides libres a fait l'objet d'un mémoire séparé, soumis pour publication au J. Invert. Pathol. . Ce travail ouvre la voie aux relations doses/effets observées au niveau des pentes de régression.

L'étude des relations doses/effets à partir des pentes de régression des interactions fonctionnelles glucido-lipidiques a fait l'objet d'un manuscrit soumis à Pesticide Biochemistry and Physiology.

C. R. Soc. Biol., 1987, *181*, 666-676.

Entomologie appliquée.

Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de *Aedes aegypti* (Insecte, Diptère) par la δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelensis*. III. Les amino-acides libres de l'hémolymphe impliqués dans l'osmorégulation

par Christian P. Vivares *, Michel Bounias **
et Bonnaventure Nizeyimana **

* *Université de Montpellier, Laboratoire de Pathologie comparée, UA INRA-CNRS n° 1184, 34060 Montpellier Cedex, France.*
** *Laboratoire de Biochimie INRA-Avignon, BP 91, 84140 Montfavet, France.*

(reçue le 22 décembre 1987).

Summary. — The variations of the haemolymph levels of the major free amino acids involved in osmoregulation, namely Asn, Ala, Arg, Gly, Leu, Pro, Ser, were determined in IVth instar larvae of mosquito *Aedes aegypti* within a 36 hrs period following treatment by the δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* suspended in the water medium at concentrations of 0.01-0.02-0.10-1.00 mg.l $^{-1}$.

During the first two hours after treatment, the concentrations of Asn, Ala, Pro, Ser, are depressed by the lower dose of toxin. By contrast, the concentrations of the whole 7 amino acids are increased with higher doses in normal looking larvae. In larvae exhibiting agony symptoms, these responses are magnified either at low doses (Pro), at high doses (Ala, Asn, Leu) or either (Ser). No correlations between the symptoms observed during agony and at the previous stages were discernable for Arg and Gly. The response to the intoxication affects in a comparable way the group of Ala, Pro, Ser which are already connected by biosynthetic relationships in healthy larvae.

Résumé. — Les variations de concentration des principaux aminoacides libres susceptibles d'être impliqués dans l'osmorégulation, soit : Asn, Ala, Arg, Gly, Leu, Pro, Ser, ont été analysés dans l'hémolymphe des larves du 4e stade du Moustique *Aedes aegypti* au cours des 36 heures qui suivent le traitement par la δ-endotoxine du *Bacillus thuringiensis israelensis* introduite dans l'eau d'élevage aux concentrations de 0,01-0,02-0,10-1,0 mg.l $^{-1}$.

Au cours des deux premières heures qui suivent les traitements, les concentrations en Ser, Pro, Ala, Asn et Leu sont abaissées sous l'action

de la plus faible dose. En revanche, ces concentrations sont augmentées dans tous les cas avec les doses élevées chez les larves d'aspect normal. Chez les larves présentant les symptômes de l'agonie, ces réponses sont amplifiées, soit aux faibles doses (Pro), soit aux fortes doses (Leu, Ala, Asn), soit aux deux (Ser). Aucune corrélation entre les symptômes d'agonie et les réponses obtenues aux stades précédents de l'intoxication n'a été observée dans le cas de Gly et Arg. La réponse à l'intoxication affecte de manière comparable ceux du groupe : Ala, Pro et Ser, qui sont déjà liées par des relations biosynthétiques caractérisées chez les larves saines.

L'étude du mécanisme d'action de la δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelensis* sur le moustique *Aedes aegypti*, vecteur de graves maladies tropicales, nous a amené à rechercher les perturbations éventuelles affectant les principaux métabolites de la larve, lorsque celle-ci est mise au contact de la toxine pendant une durée déterminée.

Nous avons ainsi, précédemment, mis en évidence des modifications de la glycémie (1) ainsi que la concentration des lipides abdominaux (2). L'amino-acidémie, composante essentielle du métabolisme, a également retenu notre attention, d'autant plus que certains acides aminés jouent un rôle important dans l'osmorégulation chez les Arthropodes (3), y compris celle des larves de *Aedes aegypti* (4) : il s'agit du groupe composé de l'asparagine, l'alanine, l'arginine, la glycine, la leucine, la proline et la sérine. Nous avons donc choisi de décrire, en premier lieu, dans le présent travail, les variations de concentrations de chacun de ces sept acides aminés dans l'hémolymphe de la larve du IVe stade d'*Aedes aegypti* au cours des 36 heures qui suivent le traitement par différentes doses de toxine.

Animaux et techniques. — Les larves du IVe stade, obtenues dans les conditions d'élevage précédemment décrites (1), ont été réparties par groupes de 25 dans des gobelets contenant 199 ml d'eau et 1 ml de suspension de toxine titrant 12 000 UI.mg^{-1}, de manière à réaliser les concentrations suivantes :

en mg.l^{-1}	0,00 (Témoins)	0,01	0,02	0,10	1,00
en UI.l^{-1}	0,00 (Témoins)	120	240	1 200	12 000

Après des durées d'action comprises entre 30 mn et 36 h, les larves sont prélevées par échantillon de 20 individus. L'hémolymphe est exprimée après incision du siphon abdominal et recueillie dans des tubes de 2 mm de diamètre, remplis d'heptane. Des volumes de 4 à 8 µl, obtenus à partir de 20 larves, sont regroupés au fond des tubes par 5 mn de centrifugation à 5 000 g. Des prélèvements de 0,5 µl sont effectués au moyen de microseringue Hamilton de capacité totale de 1 ou 2 µl, et déposés sur plaques chromatographiques à l'aide d'un applicateur manuel ou semi-automatique (DESAGA 130 195 ou PS 01). Deux types de plaques, respectivement recouvertes d'une couche mince de cellulose

(Merck 5577) ou de gel de silice (Merck 5748) ont été utilisées complémentairement, d'après les méthodes nanoquantitatives précédemment décrites (5, 6). Les enregistrements photométriques des plaques révélées à la ninhydrine ont été effectués à 550 nm et 580 nm pour l'ensemble des aminoacides, et à 330 et 350 nm dans le cas de la proline, au moyen d'un spectrodensitomètre CS 930. Parmi les 20 aminoacides, seuls l'acide aspartique et le tryptophane n'ont pas été décelés en quantité significative, excepté dans les larves intoxiquées. En outre, cinq composants supplémentaires n'ont pu être encore identifiés (4).

Les prélèvements ont été opérés, d'une part, sur des larves ne présentant aucun symptôme visible d'intoxication (douées d'une mobilité spontanée et d'une réaction au toucher comparables à celle des témoins) et, d'autre part, sur des larves présentant les signes caractéristiques de l'agonie (inertie totale et très faible réaction à l'excitation abdominale par une aiguille en acier inoxydable). Les stades d'agonie sont observés respectivement au bout de 36 h, 8 h et 6 h avec les doses (0,01 et 0,02 mg.l^{-1}), 0,1 et 1,0 mg.l^{-1}.

Les données numériques ont été exprimées en unités relatives calculées d'après les valeurs mesurées chez les témoins de même âge dans les mêmes séries. Les pentes de régression sont désignées par b et leurs écarts-types par σ_b. Dans le cas de corrélations concernant deux variables aléatoires, les pentes de régression sont données par $d = \sigma_y/\sigma_x$. Les probabilités associées aux comparaisons des moyennes et aux valeurs des coefficients de corrélation ont été calculées à partir de l'équation de distribution de « t » de Student.

Résultats. — L'aminoacidémie des larves saines ne présente pas de variations caractéristiques en fonction du temps (7, 8). Par contre, des variations ont été observées sous l'action des doses croissantes de toxine. Le tableau I indique les résultats obtenus dans le cas de l'asparagine et de l'acide aspartique. Au cours des deux premières heures de traitement, les concentrations diminuent aux faibles doses. Elles augmentent, par contre, avec les doses élevées, et au stade d'agonie.

Les variations des concentrations en sérine sont indiquées dans le tableau II. La plus faible dose de toxine abaisse les valeurs dès le début, y compris jusqu'au stade de l'agonie. Mais ce n'est qu'au bout de 24 h, qu'une diminution significative apparaît avec la dose 0,02 mg.l^{-1}. Une tendance opposée se manifeste avec les fortes doses : elle n'est significative qu'avec la dose 1,0 mg.l^{-1} au stade d'agonie.

Les variations des concentrations en glycine sont indiquées dans le tableau III. La dose 0,02 mg.l^{-1} entraîne une diminution significative en début de traitement, puis une augmentation jusqu'à l'agonie. Les plus fortes doses entraînent des augmentations dès la première heure et jusqu'à l'agonie.

La proline (Tableau IV) subit des variations d'amplitude limitée, sauf au stade d'agonie où les concentrations sont abaissées par les faibles doses et augmentées à la plus élevée. Des diminutions moins pro-

TABLEAU I. — Évolution des concentrations en asparagine (unités relatives) et en acide aspartique (mM) chez les larves d'*Aedes aegypti* soumises à l'action de la toxine du BTI.

Temps (h)	Doses de toxine en mg.l^{-1} 0,01 x (N) σ	0,02 x (N) σ	0,10 x (N) σ	1,00 x (N) σ
0,5	0,2 (4) 0,1 (b)	0,6 (4) 0,1	1,5 (3) 0,3	1,5 (3) 1,1
1	0,3 (4) 0,3	0,6 (4) 0,1	1,6 (3) 0,1	2,8 (2) 2,6
2	0,4 (4) 0,7	0,6 (4) 0,1	1,6 (3) 0,3	3,6 (3) 1,2 (a)
6	1,0 (4) 1,00	0,2 (3) 0,1 (b)	2,2 (3) 0,4 (a)	
12	4,1 (4) 1,1 (a)	0,7 (4) 0,3		
24	1,0 (4) 0,5	0,5 (4) 0,4		
36	0,2 (4) 0,1 (b)	0,4 (4) 0,1)		
Agonie	1,5 (3) 0,5	1,5 (3) 1,3	3,4 (3) 3,0	3,5 (3) 1,4 (a)
Agonie : acide aspartique (mM)	1,0 (3) 1,1	Traces	1,9 (3) 1,9	2,1 (4) 1,4

Les moyennes (x) et les écarts-types (σ) sont donnés pour (N) mesures.

Témoins : x = 1,00 (N = 4) σ = 0,44. (a) augmentation significative à P = 0,05; (b) diminution significative à P = 0,04.

TABLEAU II. — Évolution des concentrations en sérine (unités relatives) chez les larves d'*Aedes aegypti* soumises à l'action de la toxine du BTi.

Temps (h)	Doses de toxine en mg.l^{-1} 0,01 x (N) σ	0,02 x (N) σ	0,10 x (N) σ	1,00 x (N) ρ
0,5	0,4 (4) 0,1 (b)	0,9 (4) 0,1	0,9 (3) 0,1	0,9 (3) 0,1
1	0,5 (4) 0,1 (b)	0,9 (4) 0,1	1,2 (3) 0,1	1,5 (2) 0,3
2	0,4 (4) 0,3	1,0 (4) 0,1	1,3 (3) 0,3	1,9 (3) 0,6
6	0,4 (4) 0,2 (b)	1,0 (4) 0,3	1,3 (2) 0,4	
12	0,8 (4) 0,2	0,6 (4) 0,2		
24	0,9 (4) 0,1	0,4 (4) 0,2 (b)		
36	0,5 (4) 0,1 (b)	0,6 (4) 0,2		
Agonie	0,2 (3) 0,1 (b)	0,4 (2) 0,1 (b)	1,9 (3) 0,7	2,1 (4) 0,3 (a)

Les moyennes (x) et les écarts-types (σ) sont donnés pour (N) mesures.

Témoins : x = 100 (N = 4) σ = 0,23; (a) augmentation significative (P = 0,006); (b) diminution significative (P = 0,03).

TABLEAU III. – Évolution des concentrations en glycine (unités relatives) chez les larves d'*Aaedes aegypti* soumises à l'action de la toxine du BTi.

Temps (h)	Doses de toxine en mg.l⁻¹ 0,01 x (N) σ	0,02 x (N) σ	0,10 x (N) σ	1,00 x (N) σ
0,5	0,8 (3) 0,2	0,3 (3) 0,1 (b)	1,1 (3) 0,4	0,7 (3) 0,1
1	0,7 (3) 0,1	0,6 (3) 0,1 (b)	1,7 (4) 0,2 (a)	0,9 (2) 0,2
2	1,4 (2) 0,1	0,9 (3) 0,1	1,2 (4) 0,3	1,5 (3) 0,1 (a)
6	0,9 (3) 0,5	0,9 (3) 0,25	1,4 (3) 0,1 (a)	
12	0,7 (3) 0,1	2,1 (3) 0,5 (a)	—	—
24	0,5 (3) 0,1 (b)	1,3 (3) 0,2	—	—
36	3,3 (3) 1,0 (a)	11,9 (3) 2,3 (a)	—	—
Agonie	1,2 (3) 0,1	6,9 (2) 1,6 (a)	2,1 (3) 0,5 (a)	2,3 (3) 0,1 (a)

Les moyennes (x) et les écarts-types (σ) sont donnés pour (N) mesures.

Témoins : x = 100 (N = 4) σ = 0,18; (a) augmentation significative (P < 0,05); (b) diminution significative (P < 0,04).

TABLEAU IV. – Évolution des concentrations en proline (unités relatives) chez les larves d'*Aedes aegypti* soumises à l'action de la toxine du BTi.

Temps (h)	Doses de toxine en mg.l⁻¹ 0,01 x (N) σ	0,02 x (N) σ	0,10 x (N) σ	1,00 x (N) σ
0,5	0,9 (4) 0,1	0,9 (4) 0,1	1,4 (4) 0,4	0,7 (4) 0,2
1	1,0 (4) 0,1	1,0 (4) 0,3	1,3 (4) 0,4	1,8 (2) 0,4
2	0,6 (4) 0,1	0,9 (4) 0,3	1,4 (4) 0,2	1,9 (4) 0,8
6	0,4 (3) 0,1 (b)	0,8 (4) 0,2	0,9 (4) 0,2	—
12	0,7 (4) 0,1	0,4 (4) 0,1 (b)	—	—
24	1,9 (4) 0,5	0,6 (4) 0,1	—	—
36	0,7 (4) 0,2	0,4 (4) 0,2	—	—
Agonie	0,1 (4) 0,0 (b)	0,1 (2) 0,0 (b)	1,5 (4) 0,3	1,6 (4) 0,2 (a)

Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (σ) sont donnés pour (N) mesures.

Témoins : $\bar{x}$ = 1,00 (N = 4) σ = 0,35; (a) augmentation significative à P = 0,07; (b) diminution.

noncées sont également observées aux temps intermédiaires, avec les faibles doses.

L'alanine (Tableau V) subit des variations de même sens, significatives dès le début du traitement avec la plus faible dose. Les augmentations

TABLEAU V. — Évolution des concentrations en analine (unités relatives) chez les larves d'*Aedes aegypti* soumises à l'action de la toxine du BTi.

Temps (h)	Doses de toxine en mg.l⁻¹ 0,01 x (N) σ	0,02 x (N) σ	0,10 x (N) σ	1,00 x (N) σ
0,5	0,5 (3) 0,1 (b)	1,0 (3) 0,2	0,9 (4) 0,3	0,9 (4) 0,3
1	0,4 (3) 0,2 (b)	0,9 (3) 0,2	1,1 (4) 0,3	3,1 (2) 0,4 (a)
2	1,9 (3) 0,4	0,8 (3) 0,1	1,3 (4) 0,2	3,9 (4) 1,1 (a)
6	1,1 (4) 0,3	0,8 (3) 0,2	1,8 (3) 0,1 (a)	—
12	1,1 (4) 0,2	0,8 (3) 0,2	—	—
24	1,3 (4) 0,3	0,6 (3) 0,2	—	—
36	1,0 (4) 0,2	0,75 (3) 0,2	—	—
Agonie	0,5 (4) 0,3	0,6 (2) 0,4	4,3 (4) 0,9 (a)	6,4 (4) 1,4 (a)

Les moyennes (x) et les écarts-types (σ) sont donnés pour (N) mesures.

Témoins : $\bar{x}$ = 1,00 (N = 4) σ = 0,16; (a) augmentation significative (P < 0,004); (b) diminution significative (P < 0,03).

TABLEAU VI. — Évolution des concentrations en leucine (unités relatives) chez les larves d'*Aedes aegypti* soumises à l'action de la toxine du BTi.

Temps (h)	Doses de toxine en mg.l⁻¹ 0,01 x (N) σ	0,02 x (N) σ	0,10 x (N) σ	1,00 x (N) σ
0,5	0,1 (3) 0,1 (b)	0,2 (4) 0,1 (b)	0,6 (4) 0,2	1,7 (4) 1,1
1	0,4 (4) 0,1	0,2 (4) 0,1 (b)	0,7 (4) 0,2	1,6 (2) 0,6
2	2,0 (4) 0,3	0,3 (4) 0,1	0,2 (3) 0,1 (b)	4,9 (4) 2,2 (a)
6	0,7 (3) 0,2	0,2 (3) 0,3	2,3 (3) 0,1 (a)	—
12	1,1 (4) 0,3	0,2 (3) 0,1 (b)	—	—
24	4,9 (4) 0,6 (a)	0,6 (3) 0,4	—	—
36	0,6 (4) 0,1	0,2 (3) 0,1 (b)	—	—
Agonie	0,1 (3) 0,1 (b)	0,1 (3) 0,0 (bb)	5,1 (4) 1,2 (a)	2,9 (4) 2,2

Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (σ) sont donnés pour (N) mesures.

Témoins : $\bar{x}$ = 1,0 (N = 4) σ = 0,65; (a) augmentation significative à P < 0,04; (b) diminution significative à P < 0,1 et (bb) diminution significative à P < 0,04.

atteignent une amplitude importante avec la plus forte dose, à partir de 1 h jusqu'à l'agonie.

Les concentrations en leucine (Tableau VI) diminuent de manière très prononcée avec les plus faibles doses de toxine dès le début et au stade d'agonie ; en revanche, elles augmentent avec les plus fortes doses en fin de traitement et à l'agonie.

Enfin, l'arginine (Tableau VII) ne présente guère de variations aux faibles doses (excepté avec 0,01 mg.l^{-1} dès le début du traitement) mais subit des augmentations notables avec les doses les plus élevées à l'approche de l'agonie.

TABLEAU VII. — Évolution des concentrations en arginine (unités relatives) chez les larves d'*Aedes aegypti* soumises à l'action de la toxine du BTi.

Temps (h)	Doses de toxine en mg.l^{-1} 0,01 $\bar{x}$ (N) σ	0,02 $\bar{x}$ (N) σ	0,10 $\bar{x}$ (N) σ	1,00 $\bar{x}$ (N) σ
0,5	0,4 (4) 0,1 (b)	1,0 (3) 0,5	1,3 (4) 0,2	0,9 (3) 0,4
1	0,6 (4) 0,2	1,0 (3) 0,3	1,1 (4) 0,2	2,8 (2) 0,1 (a)
2	1,3 (3) 0,4	1,1 (3) 0,3	2,1 (3) 0,2 (a)	1,3 (3) 0,3 (a)
6	1,4 (3) 0,1	0,7 (3) 0,2	2,4 (3) 0,1 (a)	—
12	1,5 (4) 0,2	1,3 (4) 0,3	—	—
24	0,7 (4) 0,2	0,9 (4) 0,2	—	—
36	1,0 (4) 0,1	1,2 (4) 0,3	—	—
Agonie	1,2 (3) 0,2	1,9 (2) 0,01	3,3 (3) 0,9 (a)	1,4 (3) 0,3

Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (σ) sont donnés pour (N) mesures.

Témoins : $\bar{x} = 1,00$ (N = 4) $\sigma = 0,25$; (a) augmentation significative à $P \leq 0,01$; (b) diminution relative $P = 0,01$.

Discussion et conclusions. — Les résultats obtenus montrent que l'aminoacidémie et, plus précisément, en ce qui concerne les acides aminés impliqués dans l'osmorégulation, est très sensible à l'action de la toxine du BTi. Des perturbations de cette composante métabolique sont également provoquées par des agents pathogènes chez des moustiques. A ce propos, il convient de distinguer protéinémie et aminoacidémie. Ainsi, chez les moustiques, le Nématode *Romanonermis* provoque, à son bénéfice, une hypoprotéinémie chez *Culex pipiens* (9), *Aedes taeniarhynchus* et *Anopheles quadrimaculatus* (10) alors que l'aminoacidémie ne varie pas, excepté la concentration en proline qui augmente très fortement. L'hypoaminoacidémie est la règle chez *Culex quinquefasciatus* parasité par le Champignon *Lagedidium giganteum* (11) tandis que les concentrations en alanine, glycine, leucine et sérine augmentent, et que celles en arginine et proline diminuent. Chez les femelles d'*Ano-*

pheles stephensi, il y a hypoaminoacidémie chez les individus infectés par *Plasmodium berghei* (12) soulignée par une diminution des concentrations en asparagine, leucine et proline alors que celles en arginine et alanine subissent une augmentation. Il est à remarquer que l'analyse des acides aminés de l'organisme entier ne fournit pas les mêmes résultats chez le même hôte, *A. stephensi* parasité par *P. berghei* (13); dans ce cas, en effet, les concentrations en alanine, glycine, leucine et proline varient en sens inverse de celles observées dans l'hémolymphe.

L'action du BTi sur les larves de moustiques paraît différente de celle des parasites dans la mesure où elle aboutit globalement à une hyperaminoacidémie. Elle pourrait être due soit à une lyse cellulaire (14), soit à un déséquilibre hormonal. Notre étude montre que les aminoacides susceptibles d'être impliqués dans les mécanismes osmo-régulateurs présentent des variations de trois types différents chez les larves d'apparence normale. Ainsi, l'asparagine, la sérine et la proline présentent une diminution significative à faibles doses de toxine, suivie d'une augmentation aux fortes doses. Au temps 2 h après le début du traitement, les variations respectives des concentrations en sérine et proline sont en étroite corrélation positive (Fig. 1) :

Ser/Pro : $\rho = 0{,}979$ ($N = 5$; $P = 0{,}0004$); $d = 1{,}06$; $\sigma_d = 0{,}13$.

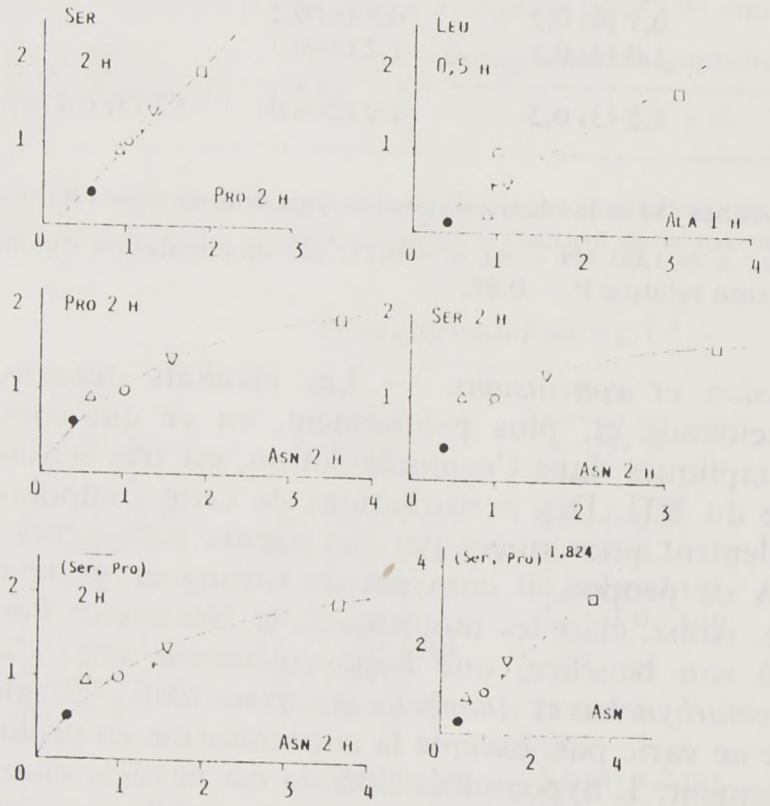


FIG. 1. — Corrélations entre les concentrations en sérine, proline, leucine, alanine et asparagine prises deux à deux, chez les larves exposées aux doses suivantes de toxine : ○ = témoins; ● = 0,01 mg/l; Δ = 0,02 mg/l; ▽ = 0,1 mg/l; □ = 1,0 mg/l.

Les variations des concentrations en proline au bout de 2 h sont en forte corrélation avec celles observées pour l'alanine au bout de 1 h, et ces deux aminoacides restent liés par une relation de même nature au stade de l'agonie (Fig. 2).

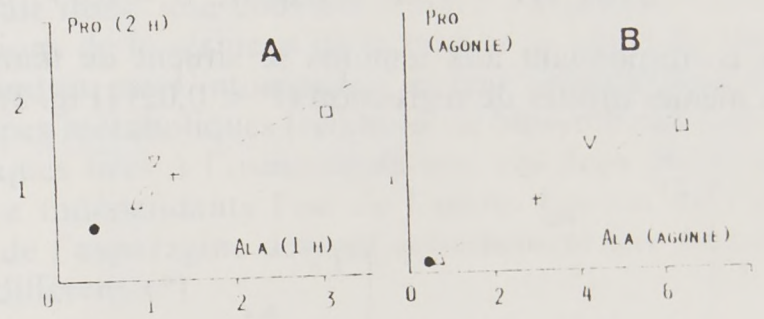


Fig. 2. — Comparaison des corrélations entre les concentrations en proline et alanine, respectivement chez les larves d'aspect normal (A) et chez les larves présentant les symptômes de l'agonie (B) (mêmes symboles que sur la Fig. 1).

Pro (2 h)/Ala (1 h) : $\rho = 0{,}926$ ($N = 5$; $P = 0{,}001$); $d = 0{,}48$; $\sigma_d = 0{,}11$.
Stade d'agonie : $\rho = 0{,}968$ ($N = 4$; $P = 0{,}005$); $d = 0{,}29$; $\sigma_d = 0{,}05$.

La sérine et la proline sont liées à l'asparagine par d'étroites corrélations positives dont les paramètres sont les suivants :

Ser/Asn : $\rho = 0{,}929$ ($N = 5$; $P = 0{,}02$); $d = 0{,}422$; $\sigma_d = 0{,}097$.
Pro/Asn : $\rho = 0{,}965$ ($N = 5$; $P = 0{,}008$); $d = 0{,}390$; $\sigma_d = 0{,}061$.

La valeur moyenne $\overline{(Ser, Pro)}$ reste donc elle-même étroitement corrélée aux concentrations en Asn ($\rho = 0{,}951$; $N = 5$; $P = 0{,}03$; $d = 0{,}40$; $\sigma_d = 0{,}076$) et la courbe représentative (Fig. 1) peut être linéarisée par la transformation en $\overline{(Ser, Pro)}^x$ dans laquelle le coefficient $x = 1{,}824$ a été préalablement déterminé par le calcul de régression en coordonnées bilogarithmiques. Les paramètres de la droite ainsi constituée (soit : $\rho = 0{,}986$; $N = 5$; $P = 0{,}002$; $d = 0{,}874$; $\sigma_d = 0{,}085$) témoignent de la force de la relation.

La leucine et l'alanine diffèrent légèrement des précédents en ce que leurs teneurs ne sont augmentées qu'avec la dose 1 mg.l^{-1}, et à des temps différents (respectivement 0,5 h et 1 h). Leurs variations sont en forte corrélation positive : Leu/Ala : $\rho = 0{,}907$ ($N = 5$; $P = 0{,}013$); $d = 0{,}57$; $\sigma_d = 0{,}15$ (Fig. 1). Enfin, l'arginine et la glycine ne présentent, en fonction des doses, que de faibles variations qui se traduisent par des droites de régression linéaires de paramètres respectifs, au bout de 2 h :

Arg/doses : $\rho = 0{,}752$ ($N = 5$; $P = 0{,}10$); $b = 1{,}03$; $\sigma_b = 0{,}52$.
Gly/doses : $\rho = 0{,}668$ ($N = 5$; $P = 0{,}18$); $b = 0{,}39$; $\sigma_b = 0{,}25$.

L'état d'agonie tend à amplifier les réponses précédentes. Dans le cas de la proline, de la sérine et de l'alanine, les variations observées sont

de même nature que chez les larves saines, ce qui se traduit par les corrélations suivantes :

Ala (1 h) : $\rho = 0{,}879$ ($N = 4$; $P = 0{,}059$); $b = 0{,}40$; $\sigma_b = 0{,}15$.
Pro (2 h) : $\rho = 0{,}925$ ($N = 4$; $P = 0{,}026$); $b = 0{,}68$; $\sigma_b = 0{,}19$.
Ser (2 h) : $\rho = 0{,}891$ ($N = 4$; $P = 0{,}050$); $b = 0{,}63$; $\sigma_b = 0{,}23$.

Les points correspondant aux témoins se situent de manière significative sur les mêmes droites de régression ($P < 0{,}02$) (Fig. 3).

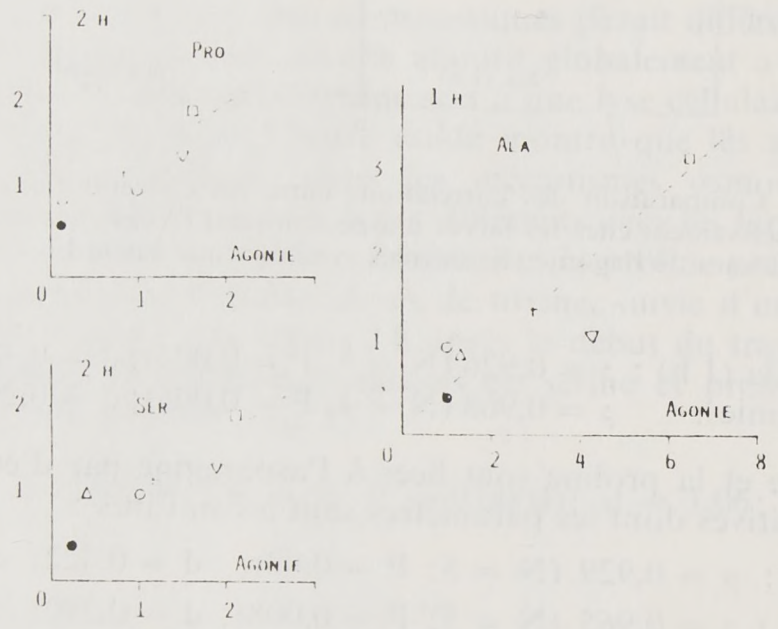


FIG. 3. — Corrélations entre les concentrations en proline, alanine et sérine chez les larves d'aspect normal et celles chez les larves à l'agonie (mêmes symboles que sur la Fig. 1).

Dans le cas de la leucine, la corrélation est affaiblie ($\rho = 0{,}426$; $P = 0{,}45$) par la plus forte concentration observée avec la dose 0,1 mg.l^{-1}, phénomène également remarqué pour l'arginine et qui pourrait provenir du fait que les larves ayant reçu la plus forte dose ont atteint le stade d'agonie très vite, avant même que les concentrations aient pu atteindre leurs valeurs maximales. Seules les augmentations des concentrations en alanine et, à un moindre degré, en sérine et en asparagine, paraissent donc susceptibles de refléter une causalité létale, alors que toutes les autres variations apparaissent plutôt, en première analyse, comme des conséquences du processus thanatologique.

Par contre, l'asparaginémie, à l'agonie, augmente rapidement, en fonction des doses, jusqu'à un plafond, tandis que la glycinémie atteint sa plus forte valeur (près de 700 % de la valeur normale) au bout de 36 h, chez les larves agonisantes exposées à 0,02 mg.l^{-1}.

Les résultats ainsi observés pourraient être, par ailleurs, confrontés avec les interrelations fonctionnelles entre aminoacides, déjà mises en évidence chez les larves saines (8). La sérine et la proline, liées par des

corrélations positives, présentent effectivement un comportement de même nature sous l'action de la toxine. Par contre, la sérine et la glycine, liées par une corrélation négative chez les larves saines, ne présentent ici aucune corrélation significative.

Il apparaît donc une cohérence entre l'évolution concomitante des concentrations de la sérine et de la proline au cours du processus thanatologique induit par l'intoxication, et leur appartenance commune, soit à des groupes métaboliques (relations de biosynthèse), soit aux fonctions physiologiques liées à l'osmorégulation, ces deux phénomènes pouvant ne pas être indépendants l'un de l'autre. Les cas de l'arginine, de la leucine et de l'asparagine devront certainement être réexaminés sous un éclairage différent (*).

Bibliographie

1. Nizeyimana B., Bounias M. & Vivarès C. P., *C. R. Soc. Biol.*, 1986, *180*, 551-563.
2. Nizeyimana B., Bounias M. & Vivarès C. P., *C. R. Soc. Biol.*, 1987, *181*.
3. Sutcliffe D. W., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1963, *9*, 121-135.
4. Edwards H. A., *J. exp. Biol.*, 1982, *101*, 153-160.
5. Bounias M. & Bounias A., *Analusis*, 1980, *8*, 287-295.
6. Bounias M., L'analyse biochimique quantitative par chromatographie en couche mince. Masson édit., 1983, 205 p.
7. Nizeyimana B., Thèse de doctorat de 3e cycle, Université de Montpellier, 1985, 330 p.
8. Bounias M., Vivarès C. P. & Nizeyimana B., *Comp. Biochem. Physiol.*, manuscrit soumis.
9. Schmidt S. P. & Platzer E. G., *J. Invertebr. Pathol.*, 1980, *36*, 240-254.
10. Giebel P. E. & Domnas A., Progress in Invertebrate Pathology. Proceedings of the International Colloquium on Invertebrate Pathology, Sept. 1978, Praha, 1979, 43.
11. Domnas A., Giebel P. E. & McInnis T. M. R., *J. Invert. Pathol.*, 1974, *24*, 293-304.
12. Mack S. R., Samuels S. & Vanderberg J. P., *J. Parasitol.*, 1979, *65*, 130-136.
13. Gad A. M., Maier W. A. & Piekarski G., *Z. Parasitenk.*, 1979, 263-276.
14. Charles J. F. & de Barjac H., *Entomophaga*, 1981, *26*, 203-212.

(*) Les auteurs tiennent à exprimer leurs remerciements à M. le Professeur Vago qui a suivi ces recherches de près, depuis leur origine.

D - Lutte contre la Varroose de l'Abeille.

Trois thésards apportaient initialement leur concours concerté à ce programme d'importance capitale.

Faute d'attribution des bourses nécessaires, deux d'entre eux ont été successivement contraints d'abandonner la recherche, après s'être endettés sans espoir pendant de longs mois. Il s'agit de M. Guiraud (secteur : toxicité effective des dérivés "anti-varroa") et de M. Cascino (toxicité chez l'abeille des composés agrochimiques xénobiotiques non cuivriques).

a) Les difficultés soulevées par l'emploi de traitements systémique et
b) les grandes lignes de l'ensemble des recherches en cours ... ont été publiées dans les revues destinées à l'apiculture pratique.

BOUNIAS, NECTOUX, CASCINO, GUIRAUD et POPESKOVIC, 1988, Revue Française d'Apiculture, n°470, p. 20-22.
(Conférence de M.B. à l'Assemblée Générale de l'UNAF, le à Paris).
BOUNIAS, NECTOUX, GUIRAUD, CASCINO, ANDRE et POPESKOVIC, 1988, L'Abeille de France, n°728, p. 284-286.

RECHERCHE

Traitements systémiques

Les facteurs influençant les traitements par nourrissement

M. BOUNIAS*, Mme M. NECTOUX*, M. P. CASCINO*, M. G. GUIRAUD*
Professeur D. S. POPESKOVIC**

Le professeur Michel Bounias nous donne, de ses expériences, des résultats encourageants, mais il tient à attirer l'attention du plus grand nombre : faire n'importe quoi, dit-il, n'est utile à personne. Les essais sauvages de traitement sont souvent mal conçus et ininterprétables.

Remerciements

Michel Bounias nous fait parvenir le compte rendu des travaux de l'équipe qu'il dirige au laboratoire de biochimie (INRA Avignon) pour l'année 1986.

La recherche n'oublie pas l'abeille et nous trouvons dans ce rapport, une majorité d'études qui la concernent ainsi que Varroa jacobsoni.

Nous notons dans les projets de recherches à venir :

— protection de l'abeille contre le varroa et contre l'action des pesticides ;

— localisation et mode d'action biochimique des acides azelaïque et pimelique chez l'abeille isolée ;

— régulation enzymatique et hormonale de la glycémie de l'abeille ;

— écotoxicologie moléculaire chez l'abeille.

Les apiculteurs sont conscients du travail déjà accompli et de l'importance des études envisagées. Nous remercions en leur nom Michel Bounias et son équipe de chercheurs.

Quel que soit le parasite visé, qu'il s'agisse du varroa ou de parasites bactériens ou fongiques, par exemple, les traitements par nourrissement présentent des avantages, des inconvénients et des contraintes.

Leur efficacité dépendra évidemment de la manière dont ces divers aspects auront été pris en compte lors des applications.

A - Les avantages

Le nourrissement est une opération couramment pratiquée, et ne nécessite donc, **à priori**, aucun investissement nouveau en matériel. En outre, il s'applique sélectivement à l'abeille, et ne perturbe pas - ou très peu - les colonies. Enfin, les manipulations peuvent être effectuées dans des conditions ne présentant aucun danger pour l'apiculteur.

B - Les inconvénients et les contraintes

Les matières actives utilisées devront présenter, vis-à-vis de l'abeille, une très faible toxicité par ingestion (1). Il s'agira donc ici préférentiellement de traitements « doux ». Elles devront, ensuite, accéder vers les sites où elles doivent agir, c'est-à-dire, par exemple, dans l'hémolymphe, s'il s'agit de lutter contre la varroatose, et ceci en quantités compatibles avec une efficacité suffisante. D'autre part, les traitements devront être effectivement ingérés et assimilés par l'abeille mais non stockés dans le miel destiné à être récolté.

Quels sont les facteurs qui vont, dès lors, conditionner cette efficacité ?

C - Les conditions d'efficacité

L'ensemble des principaux facteurs impliqués est illustré par la figure 1.

a) La prise du traitement

L'appétence du produit ou sa répulsivité vont déterminer les quantités absorbées et les vitesses d'ingestion. Des adjuvants (sucre inverti, miel, essences attractives) pourront être employés dans des conditions donnant les meilleurs résultats possibles : il est utile de souligner, ici, qu'une absorption régulièrement étalée sur une durée assez longue sera souvent préférable à une prise trop rapide.

b) La vitesse de prise de traitement

Une prise relativement lente et régulière sera beaucoup plus compatible avec le maintien dans le corps de l'abeille d'une concentration active du produit de traitement qu'une absorption rapide suivie de stockage où la substance thérapeutique ne franchirait guère le niveau du jabot. Le traitement doit passer par l'intestin pour y être absorbé à travers les membranes et passer dans l'hémolymphe.

c) La distribution trophallactique du produit de traitement

L'efficacité sera d'autant plus grande que le plus grand nombre possible d'abeilles effectivement parasitées se seront distribuées entre elles une quantité suffisante de produit.

d) L'accès au couvain

Dans certaines conditions qu'il sera nécessaire de mieux connaître afin de les maîtriser, les abeilles nourricières vont réutiliser le produit administré dans la

* *Laboratoire de biochimie, INRA-Avignon, B.P. 91, 84140 Montfavet (France).*

** *Département de biologie, faculté de médecine vétérinaire, Université de Belgrade (Yougoslavie).*

(1) N.B. Dans le cas de matières actives de très faible toxicité (qui pourront être aussi des substances organiques de synthèse), agissant à longue échéance, il est important de noter que la vitesse de destruction des parasites ne permettra de combattre leur taux de multiplication que si la densité initiale d'infestation ne dépasse pas un certain seuil.

RECHERCHE

« bouillie » larvaire, de telle sorte que le couvain bénéficiera, lui aussi, du traitement, lequel sera dès lors actif sur le couvain operculé. De nombreuses observations, et le concours de tous, seront nécessaires pour permettre de comprendre les modalités de ce mécanisme dont l'importance peut être essentielle dans certains cas. Il convient de souligner qu'un stockage sous forme de miel destiné à la seule consommation de la ruche offrira, si le produit de traitement est stable dans les conditions du milieu, une efficacité différée, pouvant se manifester à des semaines, voire à des mois d'intervalle, à l'occasion d'une redistribution aux adultes et au couvain.

e) Les différentes formes de présentation du traitement

En fonction des observations précédentes (non limitatives), il est aisé de comprendre que selon l'état des colonies et le niveau des infestations, la période de l'année et la région où le traitement sera effectué, les méthodes les plus efficaces ne seront pas toujours les mêmes. Les produits pourront être administrés, par exemple :

- en abreuvoirs, lorsque les conditions de l'environnement y sont favorables ;
- en sirops (à concentrations variables de sucre) par petits volumes répétés à intervalles rapprochés ou grands volumes distribués de manière plus espacée.
- en pâte ou « Candy », favorables à une prise étalée dans le temps ;
- en poudre fine pouvant être mélangée à du sucre glace, et pulvérisée dans le corps de la ruche ;
- en solutions pouvant être également pulvérisées dans le corps de la ruche.

f) Les relations doses/effets

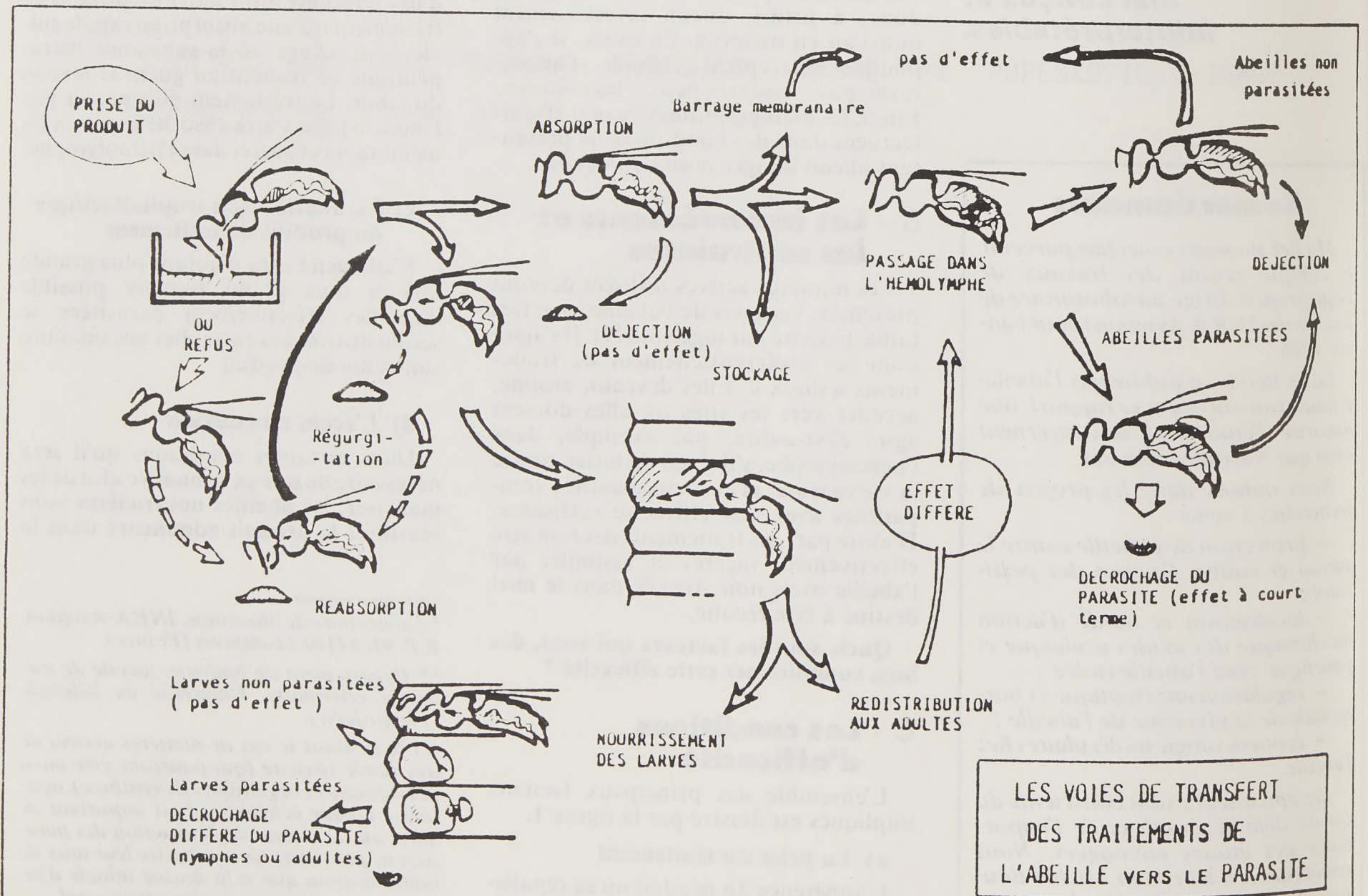
En dernier ressort, les relations doses/effets s'exprimeront compte tenu des concentrations de produits effectivement transmises aux parasites. Il est important de souligner, ici, que les effets ne seront pas nécessairement proportionnels aux doses : en fait, divers cas de relations sont à prévoir, parmi lesquels ceux que l'on nomme parfois des « effets fenêtres ». Dans ces cas là, l'effet est maximum dans une gamme définie de doses (qui peuvent être très faibles), tandis qu'il s'atténue et peut même être inversé à doses plus élevées. De tels mécanismes ont été déjà observés en enzymologie (1-2) et différentes catégories de « points singuliers » décrits en toxicologie peuvent rendre compte de certains effets masqués ou cryptotoxicologiques (3-4).

D - Résultats

La campagne expérimentale en cours a été amorcée au printemps 1987, et doit se poursuivre au cours de l'hiver 1987-1988, de telle sorte que les traitements aient été mis à l'épreuve au moins une fois à chaque saison.

Tous les modes d'application évoqués précédemment ont été employés lors d'essais réalisés avec le sulfate de cuivre, que nous considérons comme **un moyen de premier secours.**

Des résultats positifs ont été obtenus dans tous les cas : l'efficacité des traitements est variable en fonction de l'adéquation du mode d'application aux circonstances propres à chaque rucher traité. Des effets à court terme ont été



LES VOIES DE TRANSFERT DES TRAITEMENTS DE L'ABEILLE VERS LE PARASITE

RECHERCHE

démontrés sur des ruches placées sous serres grillagées (tableau 1) et des effets à long terme ont été enregistrés sur des ruchers expérimentaux à l'issue de traitements de longue durée.

Actuellement, les résultats sont en cours d'analyse et des dosages effectués dans des échantillons de miel, récoltés après les traitements, permettront de savoir si du produit a pu être incorporé dans le miel, et dans quelles proportions.

A l'issue de cette première campagne expérimentale, l'étude de nouvelles générations de produits de traitement sera reprise et intensifiée.

M. BOUNIAS, M. NECTOUX, M.-P. CASCINO, M.-G. GUIRAUD, D. S. POPESKOVIC

Les auteurs tiennent à remercier tous ceux qui ont apporté leurs concours matériel à la mise en route de ces recherches, et en particulier : l'UNAF (le docteur Bonimond, puis son successeur M. Séard et toute l'équipe), l'Abeille héraultaise et le GDSA de l'Hérault (MM. Rouquette, Pérez, Olive...), le Syndicat du Vaucluse (Madame Lambert, MM. Barbier, Grandordy, Lombard...), le CIVAM apicole (M. Carretier...), M. Laurenti (Caumont), M. Ickowicz (Bollène), M. J.-F. André (Clermont-Ferrand), et toute l'équipe du Puy-de-Dôme, ainsi que tous ceux (que nous ne pouvons malheureusement tous nommer) qui ont manifesté leur intérêt et leur appui à ces recherches.

Analyse préliminaire des relations entre l'absorption effective de sulfate de cuivre (en solution dans un sirop de saccharose) et la mortalité des varroas à court terme (0 à 3 jours) en ruches isolées sous serres grillagées.
Durée totale de l'expérimentation : 57 jours

Concentration de sulfate de cuivre (mg/l)			
	500	1000	2000
Coefficients de corrélation	ρ = 0,382	ρ = 0,732	ρ = 0,690
Nombre de couples	N = 34	N = 10	N = 10
Degré de signification*	P = 2,6 %	P = 1,6 %	P = 2,7 %
Pentes de régression**	b = 0,034	b = 0,035	b = 0,056
T (c)***	753 (101)	309 (1)	351 (9)

** Le degré de signification indique le risque que l'on accepte de se tromper en concluant à l'existence d'une relation directe entre le traitement et la mortalité des parasites.*

*** Nombre de varroas tués par ml absorbé dans les conditions particulières des ruches concernées.*

**** Ces valeurs indiquent le nombre de varroas tombés pendant les traitements puis (entre parenthèses) au cours des 3 jours qui suivent un contrôle effectué au moyen de « l'antivarroa ».*

Bibliographie

1. Sanchez (C.) et Changeux (J.-P.), *Bull. soc. Chim. Biol.*, 1966, 48, 705.

2. Bounias (M.) et Pachéco (P.), *C.R. Acad. Sc.*, Paris, 1972, 275 D, 201.

3. Bounias (M.), Nizeyimana (B.) et Vago (C.), *C.R. Acad Sc.*, Paris, 1986, 303-III, 285.

4. Nizeyimana (B.), Bounias (M.) et Vivarès (C.-P.), *C.R. Soc. Biol.*, 1987, 181, 355.

5. André (J.-F.) et collaborateurs, *Rev. Fr. Apic.*, 1987, 469.

DOSSIER

Les recherches contre la varroatose de l'abeille au Laboratoire de biochimie de l'INRA d'Avignon : 1 an après...

M. Bounias (1), Mme Nectoux (1), G. Guiraud (1), P. Cascino (1), J.-F. André (2) et D.-S. Popesković (3)

A la suite du Congrès CIVAM en Avignon, Monsieur le Professeur Bounias a aimablement accepté de nous communiquer le texte de l'intervention qui avait été préparée par lui-même et toute son équipe, et qui concerne les recherches contre la varroatose de l'abeille.

Dans l'un de ses derniers courriers, Monsieur Bounias nous faisait part de nouveaux résultats positifs qui s'ajoutent aux précédents et confortent les hypothèses de son équipe. Il nous écrit d'ailleurs être très confiant malgré les difficultés.

Nous espérons comme lui que cette méthode différente de celles connues et appliquées actuellement, viendra rapidement rejoindre l'arsenal des moyens qui devraient nous permettre dans un premier temps de maintenir la varroase à un seuil acceptable dans nos ruchers.

Orienté vers la Biochimie fondamentale et peu à peu spécialisé dans la toxicologie de l'abeille, le Laboratoire de Biochimie a dû franchir une longue série d'obstacles avant d'en arriver à relever à son tour, le défi lancé depuis plusieurs années par le **Varroa Jacobsoni.** Montrer d'abord que la glycémie et la lipémie de l'abeille sont régulées par des mécanismes enzymatiques et hormonaux, puis que la productivité de l'abeille, son activité donc, sont dépendantes de sa glycémie, telles ont été les étapes franchies après une dizaine d'années de recherches, avant la mise en œuvre des recherches toxicologiques actuelles, qui s'étendent aussi aux végétaux.

1 – LE TRAITEMENT SYSTEMIQUE ET SES CONTRAINTES

Le choix a été fait en faveur des traitements par nourrissements, en raison de leur facilité de mise en œuvre et de la libre adaptation que peuvent en tirer les apiculteurs, selon leurs habitudes.

En revanche, de tels traitements sont tributaires de facteurs tels que leur ingestion ou leur refus, par les abeilles, leur transfert vers l'intestin ou la régurgitation, enfin leur passage dans l'hémolymphe (le sang) pour y être accessible au parasite. En outre, des facteurs alimentaires tels que les suppléments protéiques, peuvent se répercuter non seulement sur l'attractivité des abeilles pour le varroa, mais aussi sur la longévité de l'abeille *(fig. 1)*.

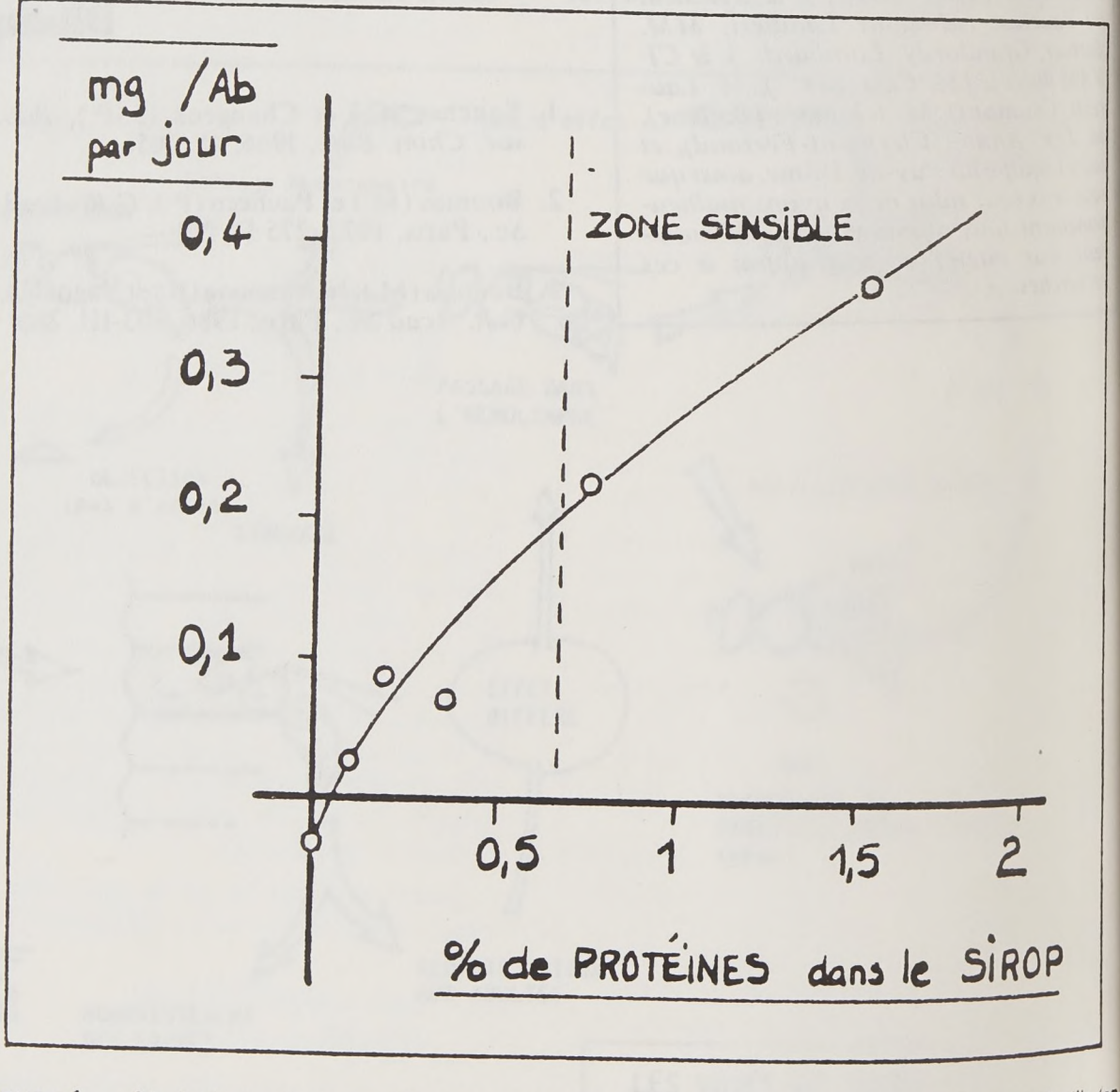


Figure 1 - Variations du taux d'incorporations des protéines dans le corps de l'abeille (en mg par abeille et par jour) en fonction de la quantité de protéines ajoutées dans le sirop de nourrissement. Sans apport supplémentaire, il y a diminution (point initial), mais au-delà de la zone sensible, la longévité des adultes peut diminuer.

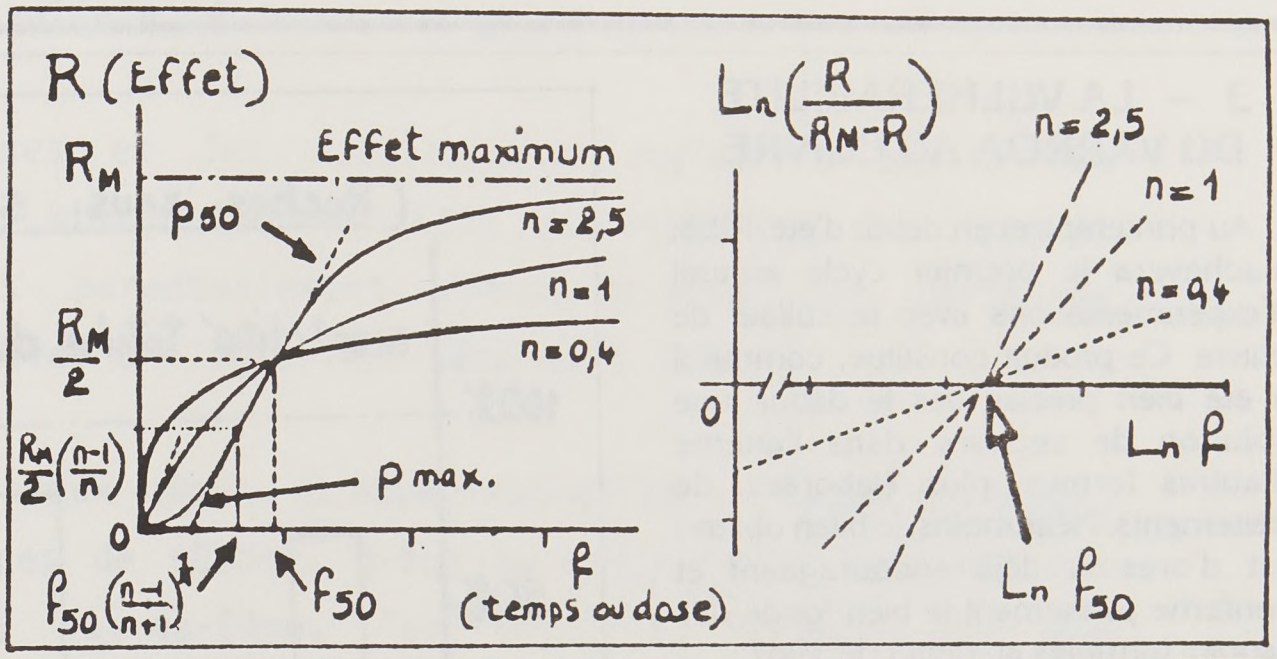
2 – TOXICITÉ ET MORTALITÉ : DISTINCTION ET DIFFICULTÉS

L'administration chronique d'un produit de traitement tel que le sulfate de cuivre ne peut être suivie au-delà de quelques semaines sans conduire les élevages aux limites de la durée de vie normale des abeilles. Les courbes normales de survie, de forme dites "sigmoïde", sont modifiées par les traitements, dont les effets ne peuvent donc être simplement traités, subjectivement d'ailleurs, en termes de pourcentage de mortalité au bout d'un délai arbitrairement choisi. De là est venue la nécessité d'un nouveau traitement algébrique des relations entre mortalité, temps et doses *(fig. 2)*.

Dans le cas d'une étude de la mortalité (R %) en fonction de doses f, R_M = 100 et $f^n 50$ est la DL50. Le coefficient n permet une adaptation de la forme de la réponse aux divers cas pouvant être observés en pratique.

La toxicité, quant à elle, est d'abord étudiée par injection **in vivo** de doses très précises de toxiques. Les effets biochimiques observés peuvent traduire des symptômes reliés d'une part à l'action thérapeutique du produit, et d'autre part, à sa toxicité. La distinction entre les deux est l'un des plus ambitieux parmi les programmes du laboratoire.

Parmi les objectifs que s'est fixée l'équipe, la mise en évidence des effets toxiques des pesticides déjà autorisés, auxquels est exposée l'abeille, a déjà fait l'objet de résultats très concrets. Ainsi, l'amitraze s'avère agir comme une hormone de type aminergique (rappelant la noradrénaline) en bloquant la glycémie de l'abeille à un niveau très élevé et donc dangereux. Mais tout en visant à identifier le mécanisme d'action, les expérimentations ont montré, en même temps que des antidotes correctement définis et injectés en même temps que le toxique peuvent en supprimer les effets *(fig. 3)*.



EQUATION GÉNÉRALE : $R = \frac{R_M \cdot f^n}{f_{50}^n + f^n}$

Paramètres toxicologiques :

R_M ; f_{50} ; n ; f(infl.) ; p_{max} ; p_{50} etc.

Figure 2 - Nouvelle approche dans l'interprétation de la réponse toxicologique R à un facteur f : l'équation générale comporte trois paramètres : R_M, n et $f^n 50$.

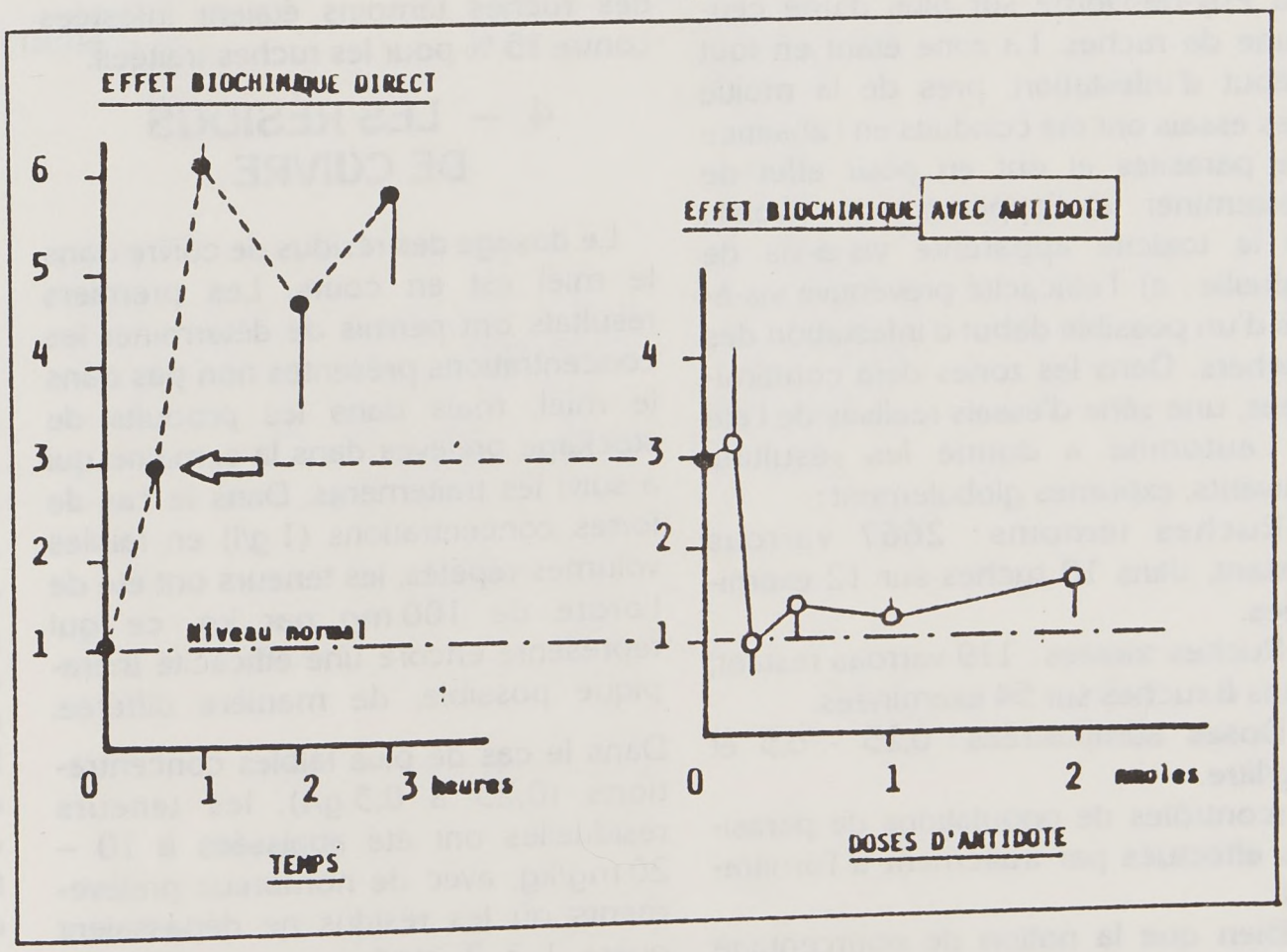


Figure 3 - Action de l'amitraze sur la glycémie de l'abeille (à droite : résultats en unités relatives, après injection de 0,25 nanomoles par abeille et sa neutralisation par un antagoniste : la phentolamine, injectée simultanément.

3 – LA VULNÉRABILITÉ DU VARROA AU CUIVRE

Au printemps et en début d'été 1988, s'achèvera le premier cycle annuel d'expérimentations avec le sulfate de cuivre. Ce produit constitue, comme il a été bien précisé dès le début, une solution de secours, dans l'attente d'autres formes, plus élaborées, de traitements. Néanmoins, le bilan obtenu est d'ores et déjà encourageant et confirme pleinement le bien-fondé des espoirs formulés au début de 1987.

Au Laboratoire, sous serres grillagées, des ruches nourries au moyen de sirops titrant 0,025 % à 0,20 % de sulfate de cuivre ont permis, dans des conditions d'isolement total vis-à-vis de l'extérieur, de démontrer :

a) que les chutes de parasites sont significativement corrélées aux volumes absorbés par les abeilles.

b) qu'un traitement poursuivi un mois peut maintenir ou ramener une ruche peu infestée à un niveau de population de varroas extrêmement réduit *(fig. 4)*.

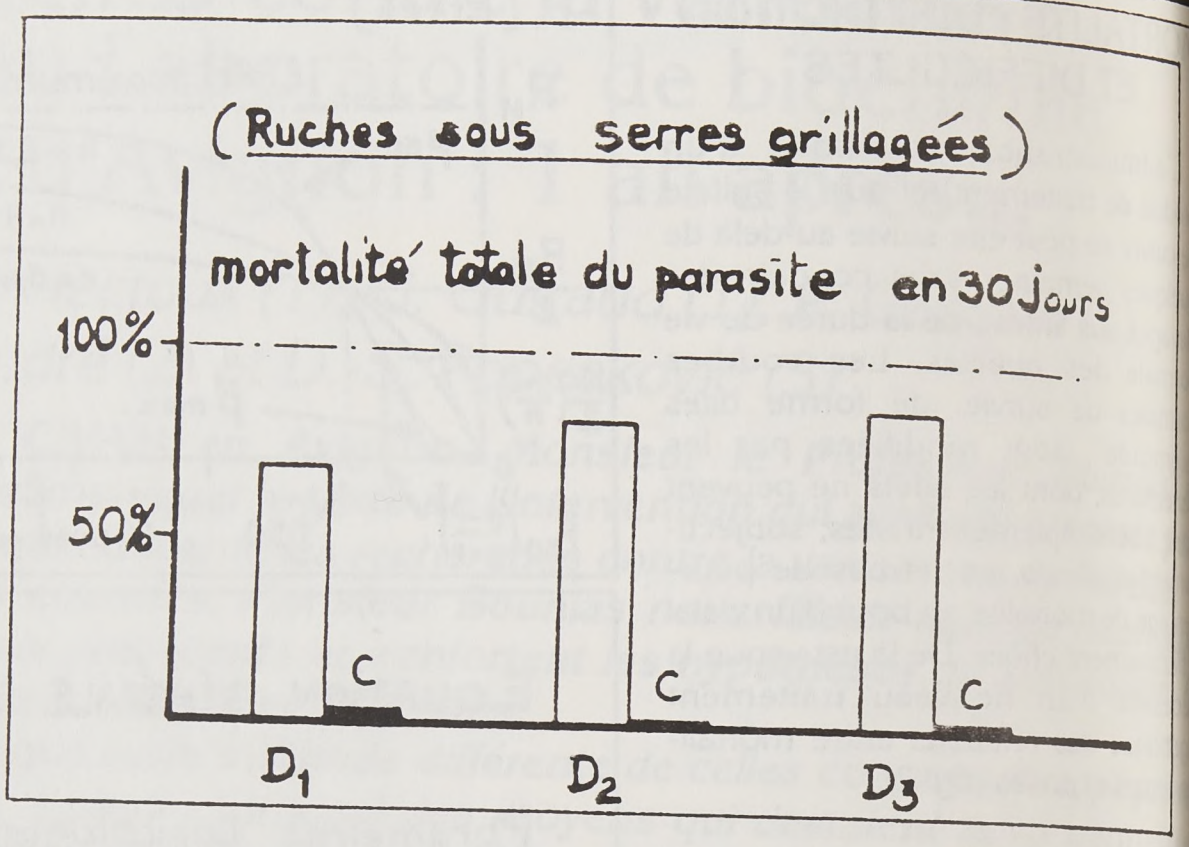


Figure 4 - Mortalité du Varroa ayant pu être corrélée à l'absorption par les abeilles de sirops contenant 0,05 % (D1), 0,1 % (D2) ou 0,2 % (D3) de sulfate de cuivre, en ruches isolées sous serres grillagées (rectangles blancs). Les rectangles noirs (c) indiquent les mortalités obtenues après les traitements de contrôle à l'amitraze.

Sur le terrain, des essais à grande échelle ont été réalisés dans la région du Puy-de-Dôme sur plus d'une centaine de ruches. La zone étant en tout début d'infestation, près de la moitié des essais ont été conduits en l'absence de parasites et ont eu pour effet de déterminer : a) l'appétence des sirops ; b) la toxicité apparente vis-à-vis de l'abeille ; c) l'efficacité préventive vis-à-vis d'un possible début d'infestation des ruchers. Dans les zones déjà contaminées, une série d'essais réalisés de l'été à l'automne a donné les résultats suivants, exprimés globalement :

Ruches témoins : 2667 varroas restant, dans 10 ruches sur 12 examinées.

Ruches traitées : 119 varroas restant, dans 8 ruches sur 54 examinées.

Doses administrées : 0,25 - 0,5 et 1 g/litre.

(contrôles de populations de parasites effectués par traitement à l'amitraze).

Bien que la notion de pourcentage d'efficacité soit d'une signification discutable, il ressort de ce bilan provisoire que les traitements ont contribué à abaisser de 95 % la population globale des parasites, telle qu'elle a évolué en l'absence de traitements en cuivre, tandis que 83 % des ruches témoins étaient infestées contre 15 % pour les ruches traitées.

4 – LES RÉSIDUS DE CUIVRE

Le dosage des résidus de cuivre dans le miel est en cours. Les premiers résultats ont permis de déterminer les concentrations présentes non pas dans le miel, mais dans les produits de stockage prélevés dans la semaine qui a suivi les traitements. Dans le cas de fortes concentrations (1 g/l) en faibles volumes répétés, les teneurs ont été de l'ordre de 100 mg par kg, ce qui représente encore une efficacité thérapique possible, de manière différée.

Dans le cas de plus faibles concentrations (0,25 à 0,5 g/l), les teneurs résiduelles ont été abaissées à 10 – 20 mg/kg, avec de nombreux prélèvements où les résidus ne dépassaient guère 1 à 2 mg/kg, ce qui, déjà, se rapproche fortement de la teneur naturelle, voisine du mg/kg. S'agissant de prélèvements précoces n'ayant encore guère à voir avec ce qui deviendra plus tard, le miel proprement dit, il semble d'ores et déjà permis d'être optimiste quant au résultat final, à la récolte.

En conclusion, le sulfate de cuivre – le plus simple parmi les traitements actuellement à l'étude – montre déjà les signes d'une efficacité tangible, qui peut en faire un moyen (au moins provisoire) de prévention et d'entretien, complémentaire des traitements de choc, toujours nécessaires dans les cas d'infestations relativement déjà importantes. Ce type de traitement "doux" devrait permettre d'éviter la multiplication de ceux présentant la plus forte toxicité potentielle pour l'abeille, inconvénient de leur "puissance de frappe". Il présente, en outre, une innocuité quasi absolue vis-à-vis de l'apiculteur, ce qui n'est pas le moindre de ses avantages. La piste mérite donc bien d'être suivie, et pourvu que les recherches puissent continuer, l'avenir ne devrait qu'apporter de nouveaux progrès, qu'il s'agisse de molécules nouvelles ou de la meilleure manière de les utiliser selon le lieu, l'époque et l'environnement.

(1) Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, BP 91, 84140 Montfavet.
(2) Président du Syndicat des Apiculteurs du Puy-de-Dôme.
(3) Professeur titulaire de la Chaire de Biologie, Faculté de Médecine, Vétérinaire de l'Université de Belgrade.

à suivre...

(Lutte contre la varroose de l'Abeille, suite)

c) Traitements au sulfate de cuivre.

Les hypothèses et les résultats préliminaires publiés en 1986 (C.R. Soc. Biol., **180**, 663-668) ont rencontré, à l'époque, un vif succès paradoxalement contre-balancé par certaines réactions négatives à l'intérieur même de l'INRA.

Au terme de deux années d'expérimentation en vraie grandeur, sur des centaines de rûches, grâce au concours du syndicat des Apiculteurs du Puy-de-Dôme, les résultats obtenus ont été confirmés et ont fait l'objet d'une publication aux C.R. Soc. Biol. fin 1988.

L'appétence des traitements, leur toxicité vis-à-vis de l'abeille, et leur efficacité contre le parasite, ont été présentées de manière détaillée.

Le concours d'un traitement de choc annuel et d'un nourrissement au sulfate de cuivre ont permis de dépasser 99% d'efficacité dans une zone où le niveau moyen d'infestation, malgré les traitements "classiques", atteint 2000 à 6000 parasites par ruche.

SOCIÉTÉ DE BIOLOGIE

C. R. Soc. Biol., 1988, *182*, 466-477.

Parasitologie.

Bilan expérimental des potentialités toxiques du sulfate de cuivre dans la lutte contre la varroatose de l'Abeille

par M. NECTOUX, J. F. ANDRÉ *, G. GUIRAUD, M. BOUNIAS • et D. POPESKOVIC **

Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, B. P. 91, 84140 Montfavet, France

* *Syndicat des Apiculteurs du Puy-de-Dôme, France.*

** *Université de Belgrade, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département de Biologie, Belgrade, Yougoslavie.*

(reçue le 19 décembre 1988).

Summary. — Cupric sulfate was administered systemically to honeybees hives in 5 to 10 l sucrose syrups at 0.2 to 1.0 g.l^{-1}. The rate of absorption was lowered by increasing concentrations, although 5 to 10 l were taken by each hive within 48 hours. The apparent relative efficacy, as determined one month then two months after treatments by comparison with controls, using an acaricide shock-treatment, ranged from 80 to 99 %. The actual efficacy determined after exhaustive numbering of parasites in gazed hives was 98 % relatively to controls, and it appeared that 75 % of the actual (reduced) parasite population in treated hives was killed by the treatments. The results were not dose-related in these field assays. Only very weak mortality symptoms, without significance, were observed without link to total dose intake by the bees of each hive. Copper residues were determined in bodies and supers of the hives from one month to 6-8 months after treatment. No increase was found in honey samples of supers and only a low significant short term increase in bodies x of treated vs control hives. The observed concentrations ranged from a max. 5.7 to a min. 0.6 mg per kg and did not increase with the total copper absorption. Copper treatments thus obviously prevent the infestation without toxicological consequences, and might be of high efficacy when combined with delayed shock treatments in more infested hives. The rate and duration of treatment by copper syrups might be of influence in the final efficacy of the method.

(•) Auquel doivent être adressées les demandes de tirés tirés à part et toute correspondance.

Résumé. — Du sulfate cuivrique a été administré aux abeilles par nourrissement à raison de 5 à 10 l par ruche d'une solution de 0,2 à 1 g/l. La vitesse d'absorption est diminuée en fonction des concentrations de cuivre, mais les volumes ont été pris dans les 48 heures. Au bout de 1 mois, puis 2 mois après les traitements, l'efficacité relative apparente, déterminée par comparaison avec les témoins à l'aide d'un traitement acaricide de choc a été de 80 à 99 %. L'efficacité réelle, mesurée avec précision par comptages exhaustifs sur des colonies sacrifiées a été de 98 %. La population de parasites (réduite) dans les colonies traitées a été abaissée de 75 % par les traitements, sans relation avec les doses. De très faibles indices de mortalité d'abeilles ont été observés, de manière non significative et, là encore, sans relation avec les quantités totales de sulfate de cuivre absorbées. Les résidus de cuivre ont été dosés dans les corps et les hausses des ruches de 1 mois à 6-8 mois après traitement. Aucune augmentation n'a été observée par rapport aux témoins, dans les hausses tandis qu'un accroissement de faible signification a été constaté à court terme dans le corps des ruches. Les concentrations mesurées ont été de 5,7 à 0,6 mg/kg, sans relation avec les doses totales de sulfate de cuivre administrées. Les traitements à base de cuivre sont donc capables de prévenir l'infestation et de juguler la réinfestation des ruches, sans effets toxiques décelables : leur association à des traitements de choc espacés, dans le cas de ruches plus atteintes, devrait présenter une haute efficacité thérapique. Le débit et la durée de l'administration des traitements au cuivre sont de nature à influencer l'efficacité finale de la méthode.

Une précédente étude (1) avait confirmé, à l'échelle du laboratoire l'hypothèse initialement soulevée par Popeskovic (1984) (2) selon laquelle le parasite de l'Abeille *Varroa jacobsoni*, serait plus spécifiquement vulnérable que son hôte à l'action d'agents antagonistes du cuivre, ou d'un excès de cuivre.

Le sulfate cuivrique a été retenu comme premier modèle expérimental, en raison de sa large diffusion et de son faible coût. Bien qu'il ait été considéré en premier lieu comme simplement destiné à mettre à l'épreuve une hypothèse, les résultats observés (3, 4) ont justifié la mise en place d'essais à grande échelle sur des ruchers expérimentaux avec le concours d'apiculteurs professionnels.

L'objet de la présente communication est de présenter le résultat final de deux années d'expérimentation pour ce qui concerne l'efficacité pratique des traitements, ainsi que les conséquences immédiates sur le comportement des abeilles et la présence de résidus de cuivre dans le miel. Des recherches de laboratoire plus détaillées sur la toxicité des traitements vis-à-vis de l'Abeille seront présentées dans un article ultérieur.

Animaux et techniques. — Les abeilles de race noire française (*Apis mellifera, mellifera* L.) proviennent de 146 ruches différentes, généralement du type Dadant à 12 cadres, réparties dans diverses localités du Puy-de-Dôme. Les nourrissements ont été réalisés au moyen de sirops contenant 6 kg de saccharose et 2 kg de miel pour 10 l d'eau, au printemps

et 6 kg de saccharose pour 4 l d'eau en automne et en hiver. Les traitements ont été réalisés par incorporation à ces sirops de sulfate cuivrique $CuSO_4$, $5H_2O$ fabriqué par la Société « La Cornubia », de Bordeaux, d'après le procédé dit « Macclesfield ». Les quantités administrées ont été de 3 à 10 l de sirop par colonie, selon la vigueur de la colonie évaluée d'après le nombre de cadres de couvain par rapport au nombre total de cadres occupés. Les concentrations de sulfate de cuivre ont été étagées de 0,20 g à 1 g/l. Les chutes de parasites tués au cours des traitements ont été observées quotidiennement sur des plaques enduites de substances gluantes situées au fond des ruches et protégées par un grillage empêchant l'accès des abeilles... Les taux d'infestation ont été contrôlés de manière indicative, après les traitements, à intervalles variant de 1 mois (été-automne) à 6-7 mois (hiver) au moyen d'un traitement à l'Amitraz (acaricide agréé, de la famille des formamidines), qui constitue un indice instantané de la densité de parasites présents sur les abeilles adultes, à l'exclusion de ceux présents dans le couvain operculé.

Pour cette raison, une série expérimentale supplémentaire a été conduite de la façon suivante avec 18 ruches, dont 11 traitées et 7 témoins : après un premier contrôle au bout d'un mois, au terme duquel aucun parasite ne tombait plus sur aucune des colonies, les observations ont été poursuivies pendant un mois supplémentaire, afin de laisser apparaître les effets prolongés à moyen terme du traitement initial, grâce au sirop médicamenteux initialement mis en réserve par les abeilles. Au terme de ce délai, un nouveau contrôle à l'Amitraz a été effectué, puis les ruches ont été anesthésiées au nitrate d'ammonium et sacrifiées par exposition prolongée à l'éther diéthylique. Les parasites présents dans les ruches ont été exhaustivement dénombrés, permettant ainsi une évaluation exacte de l'action des traitements.

La toxicité apparente des traitements a été appréciée, sur le terrain, par le dénombrement des abeilles mortes dans les nourrisseurs, ainsi que devant la ruche, sur un sac de jute de 1 m^2 disposé à cet effet devant l'entrée.

L'influence du sulfate de cuivre sur l'appétence vis-à-vis des sirops a été observée sur le terrain : l'ingestion semble freinée à partir de la concentration 0,5 g/l, mais seulement lorsque de grands volumes (3 à 5 l) sont administrés en une seule fois. Aucune influence de la quantité totale administrée par petits volumes successifs (100 ml) n'a été observée à la concentration de 1 g/l. Comme l'appétence représente un important facteur d'efficacité, nous l'avons analysée de manière plus complète au laboratoire, dans une série de cagettes de 100 abeilles chacune, équipées d'un tube de nourrissement gradué de 5 ml. Les essais ont été conduits à la température de 30° C ± 1° C et une hygrométrie de 65 ± 10 %. Les mesures des volumes absorbés ont été effectuées quotidiennement, et exprimées en µl par abeille par jour.

Le cuivre fait partie des constituants naturels du miel. Sa concentration a été mesurée à partir d'échantillons de 1 g prélevés dans le premier

cadre de réserve adjacent au nid à couvain. Les analyses ont été réalisées par spectrométrie d'absorption atomique à l'aide d'un appareil du type « Perkin-Elmer 420 » équipé d'un four « graphite HGA 76 ».

Les seuils de signification associés aux comparaisons de moyennes et aux valeurs des coefficients de corrélation ont été calculés à partir de l'équation de distribution de la variable « t » de Student. Les valeurs de t ont été calculées, compte tenu de la forte variabilité des données, par la relation : $t = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| / (\sigma_1/\sqrt{n_1} + \sigma_2/\sqrt{n_2})$ qui ne postule pas l'égalité des variances σ_1^2 et σ_2^2. Les calculs de régression linéaire ont été effectués selon la méthode des moindres carrés dans le cas d'une seule variable aléatoire et selon celle des moindres rectangles dans le cas de deux variables aléatoires.

Résultats. — 1. ACTION DU $CuSO_4$ SUR L'APPÉTENCE VIS-A-VIS DES SIROPS. — La figure 1 A présente les résultats traduisant l'influence

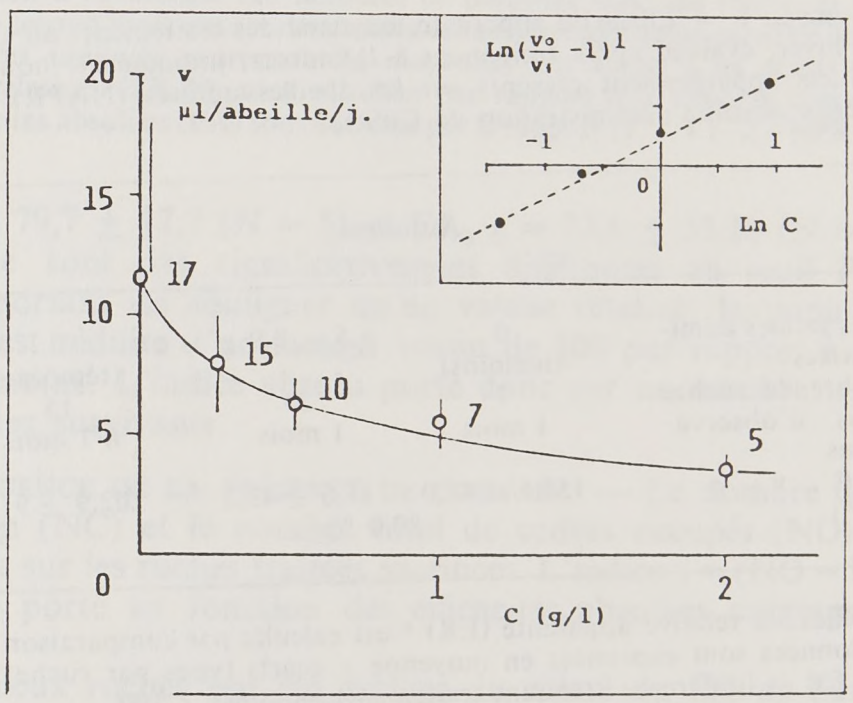


FIG. 1. — Relation entre les vitesses d'absorption de sirop (v en µl/abeille/jour) et les concentrations en sulfate de cuivre (C en g/l). A = relation directe : les écarts types tracés verticalement ont été calculés d'après les nombre de mesures portés en regard de chaque point. B = transformée bilogarithmique à partir des unités relatives (v_i = avec cuivre ; v_0 = témoins).

de la concentration en $CuSO_4$ sur l'appétence vis-à-vis des sirops administrés aux abeilles. La relation est décroissante, avec un coefficient de corrélation $\rho = -0{,}839$ ($P \simeq 0{,}06$) en coordonnées directes et $\rho = 0{,}981$ en coordonnées semi-inversées. Le traitement de la relation a été effectué par analogie avec la décroissance d'une vitesse de réaction

enzymatique (v) en fonction des concentrations en inhibiteur (I) : $(v_0/v_i - 1) = (I/I_{50})^{n_i}$ dans laquelle v_0 = vitesse initiale, v_i = vitesse en sur présence de [I], I_{50} = concentration diminuant v_0 de 50 % et n_i = coefficient de Hill de l'inhibiteur. La représentation en coordonnées bilogarithmiques (fig. 1 B) donne, pour 4 couples de mesures : $\rho = 0{,}981$ ($P \simeq 0{,}02$), $I_{50} = 0{,}526$ g/l et $n_i = 0{,}65$.

2. Efficacités apparente et absolue des traitements. — L'efficacité relative apparente, calculés après l'épreuve à l'Amitraz, par rapport aux résultats obtenus sur des ruches témoins est présentée sur le tableau I. Les résultats y ont été indiqués globalement car, dans les conditions expérimentales de terrain, aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence avec les doses totales administrées ($\rho = -0{,}030$ pour 29 colonies). Les traitements de printemps, effectués sur 14 colonies très faiblement infestées, dont 2 témoins (moins de 10 parasites par ruche), ont abouti à une prévention totale de l'infestation, soit 100 % d'efficacité apparente.

Tableau I. — Efficacité apparente moyenne des traitements au $CuSO_4$ d'automne et d'hiver, évaluée après traitement à l'Amitraz, indiquant le nombre de parasites résiduels apparemment présents sur les abeilles adultes (NAPR), après les délais indiqués depuis l'administration de $CuSO_4$.

	Automne		Hiver	
Doses totales administrées	0 (témoins)	1,5 ± 0,9 g	0 (témoins)	1,9 ± 0,6 g
Nombre de ruches	7	29	15	63
Délais d'observations	1 mois	1 mois	6-7 mois	6-7 mois
NAPR : $\bar{x} \pm \sigma$	155,6 ± 48,0	31,0 ± 43,2	202,9 ± 91,0	2,2 ± 6,2
ER (*)		80,0 %		98,9 %

L'efficacité relative apparente (ER) * est calculée par comparaison avec les témoins (les données sont exprimées en moyenne ± écarts types par ruche).
(*) ER = [différence (témoins-traitement)/témoins] × 100.

L'efficacité réelle n'a pu être établie qu'après sacrifice des colonies. Le tableau II indique l'efficacité relative provisoirement observée au bout de 1 mois, grâce à un traitement à l'Amitraz puis l'efficacité absolue établie dans la période de réinfestation couvrant le second mois, au cours de laquelle le traitement ne pouvait provenir que des réserves de sirop médicamenteux précédemment emmagasinées dans les ruches. Les valeurs obtenues restent très voisines, que les ruches aient reçu 1,25 g ou 2,5 g de $CuSO_4$ au total. Les moyennes des valeurs individuelles des efficacités absolues respectives mesurées sur chaque ruche sont

TABLEAU II. — Efficacité prolongée des traitements par $CuSO_4$.

	Volume : 5 l			Volume : 10 l		
	1,25 g $CuSO_4$	Sirop pur	ER	2,5 g $CuSO_4$	Sirop pur	ER
N	5	2	%	6	5	%
T. 1	38,4 ± 29,7	13,0 ± 7,0		13,0 ± 10,6	0,20 ± 0,44	—
NAPR. 1	19,8 ± 22,3	157,5 ± 34,5	87,4	2,5 ± 4,8	78,4 ± 60,5	96,8
T. 2	14,8 ± 12,4	24,0 ± 6,0	—	10,0 ± 7,7	79,6 ± 69,9	
NPR. 2	4,4 ± 3,4	323,0 ± 63,0	98,6	3,8 ± 4,3	333,0 ± 324,8	98,8
EA	77,1 %	—		72,5 %	—	

Les nombres moyens de parasites tombés au cours du 1er mois et au cours du 2e mois qui suivent l'absorption sont respectivement désignés par T. 1 et T. 2. Les nombres apparents de parasites résiduels (NAPR. 1) déterminés à l'issue du 1er mois proviennent du traitement à l'Amitraz. Les nombres de parasites résiduels (NPR. 2) enregistrés à l'issue du second mois ont été déterminés exhaustivement après sacrifice des colonies. Les nombres indiqués expriment les moyennes par ruche ± les écarts types. Les efficacités relatives (ER %) sont calculées par rapport aux témoins correspondants et les efficacités absolues (EA) sont données par le rapport [T. 2/TT. 2+NPR. 2)] × 100.

$EA_{1,25} = 79,7 \pm 17,7$ (N = 5) et $EA_{2,5} = 73,1 \pm 33,28$ (N = 6). Ces valeurs ne sont pas significativement différentes au seuil $P \gg 0,50$. Il est important de souligner qu'en valeur relative. la population de parasites est réduite d'un facteur voisin de 100 par rapport à celle des ruches témoins. L'indice absolu porte donc sur un nombre très réduit de parasites survivants.

3. INFLUENCE DE LA PRÉSENCE DE COUVAIN. — Le nombre de cadres de couvain (NC) et le nombre total de cadres occupés (NO) ont été déterminés sur les ruches traitées sacrifiées. L'indice $i = (NO - NC)/NO$ a pu être porté en fonction des efficacités absolues correspondantes (fig. 2).

Seules deux ruches ont été exclues du calcul du fait de l'ambiguïté qu'elles présentaient : l'une était « bourdonneuse » et l'autre n'avait subi aucune réinfestation, de sorte qu'elles se situaient à des niveaux d'efficacité opposés (100 % et 7 %) tout en présentant le même indice : i = 1. témoignant de l'absence de couvain.

Dans ces conditions, le calcul de corrélation donne une valeur de $\rho = -0,423$ (soit pour N = 9 : $P \simeq 0.25$). La droite de régression correspondante est indiquée sur la figure 2, bien que la corrélation ne soit que très faiblement significative. Les données correspondant aux traitements à 1,25 g et 2,5 g par ruche ont été regroupées du fait de l'absence de différence entre les valeurs moyennes des efficacités

correspondantes, soit respectivement : $EA_{1,25} = 74,6 \pm 15,6$ % et $EA_{2,5} = 86,3 \pm 8,8$ % soit $t = 0,986$ ($P > 0,30$).

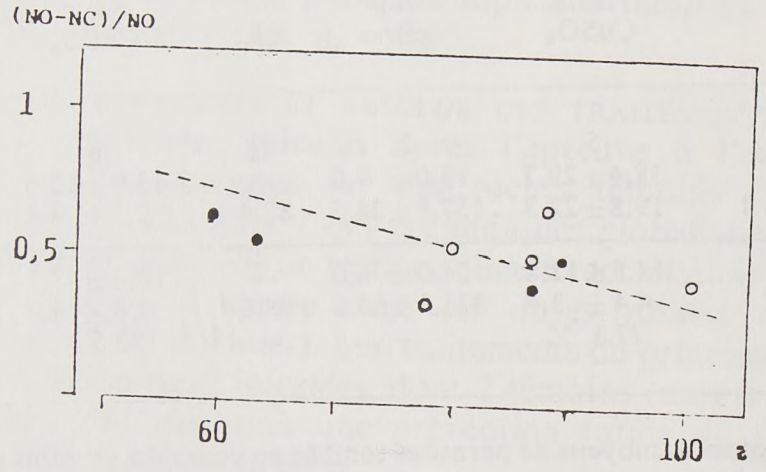


FIG. 2. — Relation globale entre l'indice d'occupation des cadres et le pourcentage d'efficacité des traitements, dans les ruches ayant reçu 1,25 g (●) et 2,5 g (o) de sulfate de cuivre.

4. TOXICITÉ A L'ÉGARD DES ABEILLES. — Le tableau III présente les résultats des observations effectuées sur le terrain sur 84 ruches, pour des concentrations allant de 0,2 à 1 g/l et des quantités totales absorbées comprises entre 1,2 et 5 g par ruche. La population moyenne d'une ruche étant de l'ordre de 20 000 à 50 000 individus, les mortalités observées peuvent être situées dans un intervalle de 0,1 à 0,3 %.

TABLEAU III. — Mortalités d'abeilles observées à l'issue des traitements par différentes doses de $CuSO_4$.

Absorption totale g/ruche	Concentrations de $CuSO_4$ g/l	Nombre moyen d'abeilles mortes par ruche	N
1,2	0,2	0,0	9
1,5	0,25	0,0	9
1,5	0,50	22,2 ± 37,0	9
2,1	0,35	1,7 ± 2,5	9
2,0	0,40	0,0	3
2,5	0,25	0,0	27
2,5	0,5	0,0	9
3,0	0,3	0,0	6
5,0	1	10 ± 5	3

N = nombre de ruches ayant fait l'objet d'observations suivies.

5. RÉSIDUS DE CUIVRE DANS LE MIEL. — Les coefficients de variation attachés à la distribution des échantillons dans une même ruche ont été calculés à partir de 19 ruches comportant chacune deux prélèvements distincts. La valeur moyenne et son écart type sont les suivants : CV = 0,225 ± 0,226. Les mesures suivantes ont été effectuées à partir des prélèvements regroupés à raison de 1 pour chaque ruche, dans des ruches ayant reçu au total 1,25 g de $CuSO_4$ (à 0,25 g/l) et dans des ruches témoins n'ayant reçu que du sirop pur.

A court terme, soit de 15 à 40 jours après l'administration du traitement (t = 27 ± 13 jours), les mesures effectuées dans les produits de stockage ont donné :

— chez les témoins : 1,97 ± 2,30 mg/kg (N = 4 ruches),
— dans les ruches ayant reçu au total : 1,25 g de $CuSO_4$: 5,74 ± 2,01 mg/kg (N = 6 ruches).

L'augmentation observée est sensible (+ 191 %) quoique les deux moyennes ne soient que très peu significativement distinctes, du fait de la forte variabilité des résultats (P = 0,092).

Les mesures effectuées à long terme, soit de 6 à 8 mois après le début du traitement, à partir de 64 ruches, sont regroupées dans le tableau IV.

TABLEAU IV. — Résidus de cuivre mesurés dans des échantillons de miel prélevés au bout de 7 ± 1 mois après administration de sulfate de cuivre.

Doses totales par ruche	Corps des ruches	Hausses
0,0 (témoins)	3,4 ± 1,9 (N = 9)	4,2 ± 3,3 (N = 3)
1,25 g	5,3 ± 2,5 (N = 28)	2,7 ± 1,7 (N = 19)
2,50 g	1,0 ± 0,25 (N = 21)	0,8 ± 1,0 (N = 21)
3,00 g	1,6 ± 1,0 (N = 6)	0,6 ± 0,1 (N = 6)

Les moyennes en mg/kg et les écarts types sont donnés pour (N) mesures.

Les traitements n'ont pas entraîné d'augmentation significative des résidus de cuivre, dont les concentrations dans le miel n'ont, curieusement, pas présenté d'accroissement en fonction des doses totales absorbées.

Discussion et conclusions. — Le sulfate de cuivre présente, en fonction de sa concentration dans du sirop de saccharose, un pouvoir répulsif susceptible de ralentir de moitié l'absorption à partir de 0,5 g/l. Ceci coïncide avec la limite à partir de laquelle certains signes de mortalité sont parfois, quoique non systématiquement, observés, et constitue

donc un facteur d'autolimitation des effets toxiques du traitement. Il paraît vraisemblable que ce phénomène soit à l'origine de l'absence de symptômes de mortalité généralement observées aux doses inférieures à 1 g/l, même lorsque la quantité totale absorbée par la ruche atteint 2,5 à 3 g soit, potentiellement, 0,05 à 0,1 mg par abeille.

Compte tenu, en outre, de la variabilité des taux de mortalité naturelle sous l'action de nombreux facteurs extérieurs, les taux observés ici n'atteignent en aucun cas les seuils considérés comme des indices de toxicité (5).

L'action contre la varroatose a été étudiée dans une zone de faible niveau initial d'infestation. Il convient de souligner, même dans de telles conditions, que la progression de la parasitose peut être extrêmement rapide : en effet, un parasite peut se reproduire jusqu'à 7 fois, et pondre jusqu'à 30 œufs par semaine (6) au rythme d'un œuf toutes les 30 minutes (7). La durée du développement varie, selon les auteurs, de 3 à 5,5 jours pour le mâle et jusqu'à 7,5 jours pour la femelle (7, 8, 9).

L'efficacité relative des traitements exprime, précisément, la limitation par le sulfate de cuivre des vitesses d'infestation observées chez les témoins. Il est intéressant de constater que les indices d'efficacité relative obtenus à l'automne soient inférieurs, quoique peu significativement, à ceux obtenus en hiver. Deux facteurs peuvent être impliqués dans cette observation : le premier tient à la température, qui semble agir sur la durée de développement du parasite selon une relation inverse (9) ; la seconde tient à la présence très réduite de couvain, en hiver, sachant que les acariens sont particulièrement attirés par les larves et les nymphes (10) sur lesquelles s'effectue la ponte.

Les indications données par l'épreuve à l'Amitraz sont confirmées par les résultats des comptages exhaustifs obtenus après sacrifices des colonies (respectivement 92,1 $\pm$ 4,7 % et 98,7 $\pm$0,1 %).

Les indices d'efficacité absolue donnent des valeurs moins élevées (74,7 $\pm$ 2,3 %) mais portant sur un petit nombre de parasites résiduels (4,1 $\pm$ 0,3) par comparaison avec les colonies témoins (328 $\pm$ 5 parasites).

La chute naturelle des parasites ne constituerait qu'un indice assez peu précis de la population totale des Varroas dans une ruche (11), et les chutes observées au cours des traitements n'ont donc guère de signification quant à l'efficacité du traitement appliqué. Le tableau II montre qu'au cours du premier mois qui suit l'absorption de sulfate de cuivre, le nombre de parasites tués est plus important que chez les témoins. Il s'agit là, à populations initialement comparables, d'un accroissement de mortalité dû au traitement. En revanche, au cours du second mois, les chutes de parasites sont plus élevées chez les témoins car les taux d'infestation y sont devenus très supérieurs, tandis que les populations de parasites étaient, à l'inverse, devenues très faibles dans les ruches traitées.

Le traitement intermédiaire à l'Amitraz, à l'issue duquel les 18 ruches concernées ne montraient plus de parasites apparents sur les abeilles adultes, n'a pas empêché la réinfestation ultérieure rapide des ruches

par les acariens restés hors de portée dans les alvéoles operculés. Il paraît vraisemblable qu'une répartition en continu de sirop contenant du sulfate de cuivre ait donc permis d'intoxiquer les Varroas au fur et à mesure de leur émergence, avec un taux moyen de 75 % (ceci se traduit dans le fait que l'efficacité n'est pas altérée par la présence de couvain, comme le montre la figure 2). Selon Korst et coll. (1982), seulement 5 % des interactions entre abeilles concernent un échange de nourriture (12), tandis que Moritz et coll. (1986) et Pershad (1966) ont évalué à un maximum allant de 30 à 50 % environ, le nombre d'abeilles recevant de la nourriture par échange trophallactique dans l'hypothèse d'une donneuse pour 30 receveuses potentielles, sous réserve que la donneuse soit âgée de 2 à 4 jours ou de 8 à 30 jours respectivement (13, 14). Les bilans observés quant à l'efficacité du traitement suggèrent donc que la probabilité est extrêmement forte pour qu'un Varroa soit tué lors qu'il parasite une abeille venant d'ingérer du sulfate de cuivre. dès

L'un des principaux facteurs limitants de l'efficacité de la méthode systémique réside donc dans la répartition du traitement entre le plus grand nombre possible d'abeilles receveuses. L'incorporation de cuivre dans la bouillie larvaire préparée par les nourricières serait, par ailleurs, de nature à combattre le parasite dans les alvéoles operculés : il reste encore à approfondir l'étude des conditions d'application des traitements qui soient les plus favorables à un tel résultat.

La zone préférentielle, la plus propice aux échanges de nourriture dans la ruche, paraît être celle des cadres de couvain, à partir du centre de laquelle une diffusion s'effectue progressivement (15, 16, 17). Ceci pourrait donc favoriser l'action systémique du cuivre vis-à-vis des parasites qui, précisément, émergent régulièrement du couvain.

Le juste équilibre entre la distribution immédiate, conduisant à une efficacité à court terme, et la mise en réserve, donnant une efficacité différée, mériterait d'être analysé de manière détaillée, en termes d'efficacité globale.

Une distribution régulière et continue par petits volumes favoriserait le premier effet, tandis qu'un apport massif, en une seule fois (ou en plusieurs distributions rapprochées) favoriserait plutôt le second.

Toutefois, les expériences réalisées avec des marqueurs colorés n'ont pas permis d'aboutir à une distinction très marquée entre ces deux modes de distribution (18).

En revanche, il apparaît avec davantage de certitude que le fractionnement de la distribution de sirop aboutirait à un abaissement de la contamination du miel (18). Comme une proportion du nourrissement de l'ordre de 2 à 6 % est incorporée dans les hausses (19), les traitements fractionnés seraient, de ce point de vue, les plus indiqués.

Il convient donc de remarquer, à cet égard, que nos analyses ont été effectuées dans les conditions favorisant le plus l'incorporation de cuivre dans le miel. Or, les teneurs observées n'ont montré qu'une augmentation faiblement significative, dans les corps de ruches, à court terme, tandis

qu'aucune augmentation par rapport aux témoins n'était observée dans les hausses, à long terme. En outre, les concentrations mesurées dans les hausses ont toujours été inférieures à celles mesurées dans les corps, après traitement. Bien que la concentration du cuivre, dans le miel — dont il est un constituant naturel —, ne soit pas réglementée en France, il reste important de veiller à ce qu'aucun excès ne se produise.

Compte tenu des résultats observés à partir de 61 ruches traitées et 13 témoins, il est permis de penser que tel ne devrait pas être le cas. Les teneurs observées restent de l'ordre de 10 à 80 fois inférieures à celles normalement présentes dans le sang et dans le foie (19). L'apport quotidien de cuivre alimentaire peut atteindre 2,5 mg/jour du seul fait des fruits, légumes et céréales (20).

Le taux normal d'élimination urinaire du cuivre (susceptible d'augmenter avec les doses ingérées) est de l'ordre de 0,20 mg/l, et l'intoxication chronique par petites doses reste considérée comme douteuse (19). Malgré la relative rareté des données toxicologiques disponibles sur les effets de cet élément, sans doute du fait qu'il s'agit d'un facteur indispensable à l'organisme (21), les données expérimentales actuelles ne laissent pas craindre de danger en provenance des traitements contre la varroatose.

Il semble donc permis de conclure que les essais de traitements systémiques à base de cuivre ont confirmé, au niveau du terrain, l'efficacité potentielle, suggérée par de précédentes expériences. Ils ont, en particulier, présenté une importante efficacité dans la prévention et la limitation de l'infestation dans le cas de ruches initialement peu ou modérément atteintes. Combinée à des traitements de choc (pouvant être physiques, par exemple : thermiques (22) ou olfactifs, etc.) effectués à titre complémentaire de manière espacée, et à la pratique de l'essaimage artificiel, l'administration de cuivre permettra vraisemblablement de maintenir les populations de parasites à un niveau compatible avec une apiculture dynamique. En outre, non seulement les traitements n'ont montré aucune conséquence défavorable au développement des colonies, mais ils ne présentent aucun danger pour les manipulateurs, puisqu'il faudrait absorber en une seule fois plus d'une dizaine de litres de sirop pour s'exposer à un danger. La suite de nos recherches est orientée vers l'utilisation d'autres dérivés présentant divers avantages importants sur le sulfate, et compte tenu de la nécessité d'éviter toute confusion entre les concepts respectifs de toxicité et de mortalité, l'effort est essentiellement axé, maintenant, sur l'analyse des effets sublétaux de ces composés, chez l'Abeille, à l'échelle moléculaire (*).

(*) Les auteurs expriment leurs vifs remerciements aux animateurs et aux apiculteurs du syndicat du Puy-de-Dôme, qui ont prêté leurs concours enthousiate à ces recherches, ainsi qu'à M. Pérez du service de répression des fraudes de Montpellier, pour avoir permis le dosage des résidus de cuivre dans son laboratoire et à Mme Bareste pour la préparation matérielle du manuscrit. Ils tiennent à souligner que ce travail a bénéficié d'un soutien financier et matériel de l'association Intermiel (Paris), de la Société Bénéchim (Belgique), de l'U. N. A. F. (Paris), de l' « Abeille Héraultaise » et du Syndicat des Apiculteurs du Vaucluse ; le sulfate de cuivre a été aimablement fourni par la Société « La Cornubia », de Bordeaux

BIBLIOGRAPHIE

1. Popeskovic D. & Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1986, *180*, 663-668.
2. Popeskovic D., 3e Symp. Internat. sur Varroa, Split (Yougoslavie), 1984, 33-35.
3. Bounias M., Nectoux M., Guiraud G., Gascino P. & Popeskovic D., *Rev. Fr. Apic.*, 1988, *470*, 20-22.
4. Bounias M., Nectoux M., Guiraud G., Cascino P., André J. F. & Popeskovic D., *L'Abeilie de France*, *1988*, *728*, 284-286.
5. Bocquet J. C., Bos C., Debray C., Hervé J. J., Le Brun-Keris N., Mesquida J., Missonnier J., Patault Y. & Roussel G., Rapport Commission des Essais Biologiques, 1982, Méthode n° 95, 19 p.
6. Ruijter A. de, *Apidologie*, 1987, *18*, 321-326.
7. Ifantidis M. D., *J. Apic. Res.*, 1983, *22*, 200-206.
8. Ifantidis M. D., *J. Apic. Res.*, 1984, *23*, 227-233.
9. Laurent J. C. & Santas L., *Apidologie*, 1987, *18*, 53-60.
10. Schulz A. E., *Apidologie*, 1984, *15*, 401-420.
11. Rademacher E., *Apidologie*, 1985, *16*, 395-406.
12. Korst P. J. A. M. & Velthuis H. H. W., *Insectes Sociaux*, 1982, *29*, 209-221.
13. Moritz R. F. A. & Hallmen M., *Insectes sociaux*, 1986, *33*, 26-31.
14. Pershad S. V., *Insectes Sociaux*, 1966, *13*, 323-328.
15. Courtois G., Lecomte J. & Salleron F., *C. R. Acad. Sc.*, 1961, *252*, 1057-1059.
16. Douault P., *Ann. Abeille*, 1967, *10*, 39-44.
17. Douault P., *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, 1967, *264D*, 1092-1095.
18. Moritz R. F. A., Koeniger N. & Maul V., *Apiacta*, 1981, *16*, 57-64.
19. Douault P., Louveaux J., Theurkauff J., Azeuf P. & Pintena J., *Apidologie*, 1974, *5*, 107-126.
20. Rivai I. F., Suzuki S., Koyama H., Hyodo K., Djuangsih N. & Soemarwoto O., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1988, *4*, 114-120.
21. Harper H. A., Rodwell V. W. & Mayes P. A., Précis de Biochimie. Presses Univ. de Laval (Québec), 1982, 697-699.
22. Stell M., *Rev. Fr. Apic.*, 1987, *468*, 510.

d) Toxicologie du sulfate cuivrique chez l'abeille.

Les recherches ont été conduites sous deux angles complémentaires, dans le cadre de la thèse de Doctorat préparée par Mme M. Nectoux.

Variations des cinétiques de mortalité sous administration chronique per os.

Cette étude, achevée en fin d'année et publiée aux C.R. Biol. a permis de réaliser la première mise à l'épreuve expérimentale de la thorie toxicologique intégrée en cours d'élaboration (Bounias, non publié). Les résultats ont abouti à la détermination des valeurs numériques de plus ieurs nouvelles constantes toxicologiques et fait apparaître l'extrême variabilité de la DL_{50}.

C. R. Soc. Biol. 182 (6) Sous presse

Toxicologie

Toxicologie du sulfate cuivrique chez l'abeille :

1 - Nouveaux parametres algébriques de létalité comme alternative à la DL_{50}.

par Myriam NECTOUX et Michel BOUNIAS*

Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, BP 91,
F84140 MONTFAVET

*auquel les demandes de tirés à part doivent être adressées.

Toxicology of cupric sulfate in honeybees : 1 - New algebraic lethality parameters substituted to the LD_{50}.

Summary.- A full kinetic study, over the whole life span of individuals, has been performed on the lethality of honeybees receiving by chronic administration : 0 ; 0.25 ; 0.5 ; 1 ; 2 $g.l^{-1}$ of cupric sulfate in sucrose syrups. Three algebraic parameters, based on the Hill equation, allow a complete description of the curves : the time corresponding to the death of 50% of the individuals (TL_{50}), the Hill coefficient (n_t) and the slope of the tangent at the inflexion point (Δ) corresponding to the maximum mortality rate. Studying the variations of the 3 parameters versus administered doses, leads to new relations allowing the calculation of the dose decreasing by half the 50% survival time of controls (dT_{50}), and the doses increasing up to half the maximum, the value of n_t (dn_{t50}) and the value of Δ ($d\Delta_{50}$). The experimental data gave : $dT_{50}=0.27$ $g.l^{-1}$; $dn_{t50}=0.51$ $g.l^{-1}$; $d\Delta_{50}=0.93$ $g.l^{-1}$.

These indexes, which represent new objective parameters for the characterization of lethality, should be substituted to the LD_{50} whose values vary between zero and infinite according to the time arbitrarily choosen for their calculation, and wear only a very restrictive significance.

Résumé.- Une étude cinétique complète, portant sur la durée totale de vie des individus, a été réalisée sur la mortalité de lots d'abeilles recevant, en administration chronique du sulfate cuivrique aux concentrations de 0 : 0,25 : 0,5 : 1 et 2 g par litre de sirop de saccharose. Trois paramètres algébriques, basés sur l'équation de Hill, permettent de décrire complètement les courbes : le temps au bout duquel 50% des individus sont morts (TL_{50}), le coefficient de Hill (n_t) et la pente de la tangente au point d'inflexion (Δ) correspondant à la valeur maximale de la vitesse de mortalité. L'étude des variations de ces trois paramètres en fonction des doses administrées conduit à des relations permettant le calcul de la dose diminuant de moitié le temps correspondant à 50% de demi-survie des témoins (dT_{50}), de celle élevant jusqu'à 50% du maximum calculé, la valeur de n_t (dn_{t50}) et celle de Δ ($d\Delta_{50}$). Les valeurs expérimentales obtenues ont été : dT_{50}=0,27 g.l^{-1} ; dn_{t50}=0,51 g.l^{-1} ; $d\Delta_{50}$=0,93 g.l^{-1}.

Ces indices constituent de nouveaux paramètres objectifs de létalité, susceptibles de remplacer les DL_{50} dont les valeurs varient entre zéro et l'infini, en fonction du temps arbitrairement choisi pour les calculer, et ne revêtent qu'une signification restreinte.

De récentes expérimentations [1] ont confirmé l'efficacité des sels cuivriques administrés par voie systémique chez l'abeille, comme traitement de fond de la varroose. La faible toxicité observée sur le terrain, vis à vis des colonies d'abeilles, a corroboré, par ailleurs, les hypothèses précédemment formulées sur la relative spécificité de la cible physiologique que constitue l'équipement cupro-protéique de l'hémolymphe du parasite [2].

La voie systémique implique, cependant, une diffusion du produit dans le tractus digestif de l'abeille, et la traversée des membranes intestinales vers le milieu circulant qui baigne l'ensemble des tissus. Bien que l'abeille ne possède pas d'hémocyanines, il ne pouvait être exclu qu'une certaine diffusion des sels cuivriques se produise vers des organites tels que les mitochondries où diverses classes d'enzymes pourraient en être affectées [3]. Cette hypothèse aurait suffi, à elle seule, à justifier une étude de la toxicité des sels cuivriques vis à vis de l'abeille, et en premier lieu une analyse de la mortalité en fonction du temps et des doses administrées.

L'attention des toxicologistes a été attirée, depuis plusieurs années, sur certaines difficultés soulevées par l'emploi systématique de la DL_{50}, considérée comme variable en fonction de nombreux facteurs et ne constituant pas une véritable constante biologique [4][5]. Récemment, de nouveaux concepts algébriques ont été proposés en vue de remplacer la DL_{50}, ainsi que la méthode des probits qui permet de la calculer, par des paramètres présentant un caractère plus objectif [6].

L'objet du présent travail était donc d'analyser comparativement la mortalité de l'abeille en réponse aux traitements par le sulfate de cuivre, à l'aide de ces divers procédés.

Animaux et Techniques.- Les abeilles ouvrières de race locale (Apis mellifera, mellifera L.) éclosent pendant 12 à 24 h à l'obscurité, dans une enceinte régulée en température (30±1°C) et en hygrométrie (65±10%). Elles sont ensuite prélevées par groupes de 100 individus placés chacun dans une cagette d'élevage de 8x9x10 cm. Le nourrissement est réalisé par du sirop de saccharose pur (1 Kg par litre d'eau) ou additionné de sulfate de cuivre ($CuSO_4$, 5 H_2O, fabriqué par la société "La Cornubia"). Aucun apport complémentaire de type pollinique n'a été mis à la disposition des abeilles au cours des expériences décrites. Chaque cagette est équipée d'un tube gradué, d'une contenance de 5 ml, permettant un suivi continu des volumes ingérés. Les mortalités sont relevées matin et soir et les cagettes sont nettoyées quotidiennement. Les mesures sont poursuivies jusqu'à la mortalité totale de chaque lot.

Pour l'ensemble des expériences décrites, il a été utilisé 700 abeilles, dont 300 témoins (non traitées par $CuSO_4$).

L'analyse des paramètres de létalité a été effectuée selon les nouveaux principes décrits ailleurs [6], et, parallèlement, selon la méthode classique [7].

Pour une corrélation (ρ) calculée à partir de (N) couples de mesures, la pente de régression étant désignée par b, son écart-type a pour valeur : $\sigma_b = [(b/\rho)^2 - b^2]/(N-2)$

Résultats.- 1 - Résultats cinétiques. La figure 1 présente les courbes de mortalités obtenues chez les témoins et à 4 doses différentes de sulfate cuivrique. Les abeilles témoins ont vécu jusqu'à 37 jours, et celles recevant 0,25 $g.l^{-1}$ de sulfate cuivrique jusqu'à 28 jours, tandis que chez les abeilles recevant la plus forte dose (2 $g.l^{-1}$), la mortalité était complète au bout de 10 jours.

Les propriétés des diverses courbes cinétiques peuvent être décrites complètement par les trois paramètres de l'équation de Hill, qui constitue une base déterministe, par

opposition aux équations probabilistes du type des probits [8] :

$$M\% = \frac{M_{max} . t^{nt}}{TL_{50}^{nt} + t^{nt}} \quad (1)$$

$M\%$ est le pourcentage de mortalité observé à l'instant t.
M_{max} est le maximum asymptôtique, soit $M_{max} = 100\%$.
nt est le coefficient de Hill de la relation.
TL_{50} est le temps au bout duquel 50% des animaux sont morts, chez les témoins comme chez les traités.

Les paramètres TL_{50} et nt permettent d'en définir un troisième : Δ, qui est la tangente au point d'inflexion des courbes, c'est-à-dire la valeur maximale de la vitesse de mortalité (exprimée ici en $\%.j^{-1}$) [6] :

$$\Delta = \frac{M_{max}}{4} . TL_{50}^{-1} . nt^{-1} . [(nt-1)^{nt-1} . (nt+1)^{nt+1}]^{1/nt} \quad (2)$$

Compte tenu de l'évidence selon laquelle, dans le cas d'une cinétique de mortalité, $M_{max} = 100\%$, les valeurs de TL_{50} et de nt découlent de la forme logarithmique de l'équation (1) :

$$Ln\left(\frac{M\%}{100-M\%}\right) = nt . Ln(t) - nt . Ln(TL_{50}) \quad (3)$$

dont ils constituent respectivement la pente de régression et l'abcisse à l'origine. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 1.

2 - Relations doses/effets. Les paramètres TL_{50}, nt et Δ sont des variables liées aux doses.

A- L'expression des TL_{50} en fonction des concentrations en sulfate cuivrique présente l'allure d'une branche d'hyperbole descendant asymptôtiquement vers zéro à partir de la valeur finie mesurée chez les témoins (fig 2A). Son équation peut être définie, par analogie avec celle des mécanismes généraux

d'inhibition enzymatique :

$$\frac{TL_{50(0)}}{TL_{50(i)}} - 1 = \left(\frac{d_i}{dT_{50}}\right)^{nc} \qquad (4)$$

dans laquelle $TL_{50(0)}$ est la valeur mesuree chez les temoins et $TL_{50(i)}$ celle obtenue a la concentration d_i de toxique. L'expression dT_{50} designe la concentration qui reduit de moitie le temps $TL_{50(0)}$.

La transformation de l'equation (4) en coordonnees bilogarithmiques conduit a une droite (fig 2B) de pente n_c et d'abcisse a l'origine dT_{50}.

Les valeurs experimentales ont permis de calculer ici, a partir de 4 couples de mesures (ρ=0,995) :

$n_c = 0,74 \pm 0,05$

$dT_{50} = 0,27$ g.l^{-1} (dose a laquelle le temps necessaire pour observer la mort de 50% des individus est reduit de moitie par rapport aux temoins).

B- Le coefficient de Hill du facteur temps montre des variations de type sigmoïde (fig 3) dont l'expression, diminuee de la valeur observée chez les temoins ($n_t - n_{t0}$) est encore decrite par une equation de Hill. Le calcul de la valeur maximale asymptotique, obtenu sans approximation, a partir des 3 points disponibles (d = 0,5 ; 1 et 2 g.l^{-1}), a l'aide de l'equation precedemment decrite [9] donne : $n_{tmax} \approx 6,00$ et $dn_{50} = 0,51$ g.l^{-1}.

La courbe, d'une sigmoidicite très prononcée, admet elle-meme pour coefficient de Hill de n_t vis a vis du facteur dose : $n_n \approx 7,5$.

$$(n_t - n_{t0}) = \frac{(n_{tmax} - n_{t0}).d^{nn}}{(dn_{50})^{nn} + d^{nn}} \qquad (5)$$

C- Les variations de la pente Δ en fonction des doses sont illustrees par la figure 4. La vitesse de mortalite suit une courbe sigmoïde comportant une phase d'acceleration, puis un point d'inflexion (correspondant au Δ maximum) suivi d'une phase de ralentissement. Celle-ci peut conduire, ou non, a une limite asymptotique, selon les cas examines.

Le phenomene peut, à son tour, etre decrit provisoirement par une équation de la forme suivante (fig 4A) :

$$(\Delta - \Delta_0) = \frac{(\Delta_{max} - \Delta_0).d^{n\Delta}}{d\Delta_{50}{}^{n\Delta} + d^{n\Delta}} \qquad (6)$$

d = dose de toxique (ici : $CuSO_4$) entrainant la vitesse Δ.

Δ_0 = vitesse observee chez les témoins.

Δ_{max} = limite superieure asymptotique apparente de la vitesse maximale de mortalite.

$n\Delta$ = coefficient de Hill de Δ vis a vis de l'effet des doses.

$d\Delta_{50}$ = dose augmentant la vitesse de mortalite jusqu'a 50% de la valeur maximale (Δ_{max}) apparente.

Les donnees obtenues avec le sulfate de cuivre permettent le calcul precis de Δ_{max} à partir des 4 points disponibles, a l'aide de la relation suivante, recemment proposee [6] :

Si d_i et d_j sont deux doses telles que :

$d_i.d_j = d\gamma^2$, et Δ_i, Δ_j les pentes respectives correspondantes, si d'autre part : $X = (\Delta_i.\Delta_j)^{-1}$ et $Y = \Delta_i^{-1} + \Delta_j^{-1}$, alors la droite de regression de Y sur X s'ecrit :

$$Y = \Delta_{max}.X + \Delta_{max}^{-1}.[1 - (d\Delta_{50}/d\gamma)^{2n}] \qquad (7)$$

Ici, pour N = 2 et $d\gamma^2 = 0,5$, $(\Delta_{max} - \Delta_0) = 33,65$ %.j^{-1}, soit compte tenu de $\Delta_0 = 3,08$ %.j^{-1} : $\Delta_{max} = 36,7$ %.j^{-1}

La forme logarithmique de l'equation (6) (fig 4B) peut alors etre utilisée pour le calcul de $n\Delta$ et de $d\Delta_{50}$, connaissant Δ_{max}.

$$\text{Ln}\frac{\Delta}{\Delta_{max} - \Delta} = n\Delta.\text{Ln}(d) - n\Delta.\text{Ln}(d\Delta_{50}) \qquad (8)$$

Pour N = 4 couples, $\rho = 0,9995$, $n\Delta = 1,84 \pm 0,04$ et $d\Delta_{50} = 0,93$ g.l^{-1}

D- L'expression directe de la mortalite en fonction des doses, conduisant au calcul classique de la DL_{50}, ne peut etre etablie que pour une valeur definie du temps (t). Il est donc possible de calculer autant de valeurs de la DL_{50} qu'il existe de valeurs de (t) permettant d'effectuer le calcul de régression des probits de mortalite sur le Logn des doses.

Nos données expérimentales autorisent ce calcul pour t = 6 jours, 7 j, 10 j, 13 j et 17 j, à partir des données transformées selon la correction de Abbott (fig 5) :

$$MC\% = 100.(M - M_0)/(100 - M_0) \quad (9)$$

MC = mortalité corrigée au temps t.

M_0 = mortalité observée chez les témoins au temps t.

Les différentes valeurs de la DL_{50} obtenues pour chaque valeur de t sont présentées dans le tableau 2.

La courbe représentative (fig 6A) présente l'aspect d'une branche d'hyperbole descendante, dont l'équation peut s'écrire :

$$DL_{50} = (\alpha.t + \beta)/(\delta.t + \epsilon) \quad (10)$$

Lorsque t tend vers l'infini, la mortalité tend vers 100%, y compris pour les témoins (d=0) : la DL_{50} admet alors une limite inférieure nulle, puisque $DL_{50} \leq DL_{100}=0$, de sorte que $\alpha=0$. Une représentation linéaire peut alors être obtenue en coordonnées semi-inversées (fig 6B), soit :

$$(DL_{50})^{-1} = (\delta/\beta).(t) + \epsilon/\beta \quad (11)$$

Le calcul de régression effectué à partir des données expérimentales donne, pour N = 5 couples de points : $\rho = 0,996$; $\delta/\beta = 0,344 \pm 0,018$ et $\epsilon/\beta = -1,52$. La DL_{50} tend donc vers une valeur supérieure infinie lorsque le temps au bout duquel elle est mesurée tend, dans les conditions de l'exemple proposé, vers la valeur limite : $t = -\epsilon/\delta = 4,4$ jours qui en constitue l'asymptôte (fig 6A).

Discussion et Conclusion - L'analyse basée sur l'exemple de l'action du sulfate de cuivre sur la mortalité de l'abeille montre, en concordance avec les critiques formulées récemment à cet égard [4][5][6], que la DL_{50} est un paramètre entâché de subjectivité puisque fonction hyperbolique du temps au bout duquel elle est calculée, entre autres facteurs de variations. Le choix arbitraire d'une durée particulière est donc susceptible de conférer à la DL_{50} des valeurs extrèmement différentes. De fait, les mesures effectuées indépendamment par divers chercheurs sur la DL_{50} des pesticides chez l'abeille,

donnent pour le même produit des valeurs divergentes dans un rapport de 1 (pour le TEPP), à 372 pour le diazinon, et 953 pour l'oxydéméthon méthyl [10]. Ces différences tiennent vraisemblablement à ce que la physiologie de l'abeille varie énormément en fonction de l'âge des individus [11][12], de sorte que, réciproquement, toute variation d'ordre physiologique, même à un âge défini, est susceptible de se traduire par des écarts dans la DL_{50} correspondante.

Les méthodes que nous proposons font appel à l'analyse de l'ensemble de la courbe de survie des animaux, et couvre donc les deux aspects de la toxicité à court terme et à long terme, qui ne nous semble guère pouvoir être objectivement dissociés.

D'autre part, la mortalité n'est pas due au hasard, mais au concours de facteurs physiologiques et moléculaires, naturels et toxicologiques propres à chaque individu.

C'est l'une des raisons pour lesquelles nous avons opté pour une équation déterministe, plutôt que pour les relations probabilistes usuelles. L'équation de Hill offre, en outre, l'interêt de permettre le calcul d'une série de paramètres descriptifs non soumis à un choix arbitraire, par des méthodes relativement simples et ne faisant appel à aucune approximation. Parmi ces paramètres, le temps de survie a déjà été pris en considération, sous d'autres formes, par divers auteurs [13][14]. Ceux-ci ont étudié soit le LT_{90} [13], soit le temps individuel de survie des sujets, en fonction des doses [14], mais aucun n'a envisagé une étude suffisamment prolongée pour inclure les témoins. Leurs courbes présentait donc l'allure d'hyperboles sur lesquelles, malencontreusement, aucune valeur n'était définie pour une dose nulle de toxique.

Le paramètre TL_{50}, tel que nous l'avons envisagé, constitue, comme les précédents, une fonction décroissante des doses, mais il est défini, en outre, par référence à la valeur mesurée en l'absence de toxique et décrit par un formalisme algébrique qui n'avait pas été utilisé jusqu'ici. L'indice dT_{50} qui en résulte (dose qui diminue de moitié la demi-vie (ou période) d'une population), constitue un premier paramètre toxicologique strictement objectif. Il s'avère particulièrement

Or, des abeilles de tous âges sont en contact avec les toxiques, en particulier agrochimiques, qui affectent donc des individus dont, par exemple, la composition en amino acides et en ions minéraux varie aussi de manière considérable [18]. D'autre part, la toxicité aigue ne rend compte que de traitements de courte durée [15] alors que, dans le cas du traitement de la varroose de l'abeille, par exemple, le comportement du parasite, qui se refugie dans le couvain operculé où il se développe à l'abri des acaricides [19], rend necessaire le recours à des traitements de longue durée.

Les nouvelles orientations toxicologiques que nous proposons, sur la base de parametres algébriques objectifs et d'une large portée, paraissent donc de nature à apporter un progrès tangible dans des circonstances où les methodes classiques en sont venues à présenter, en dépit des services qu'elles ont rendus autrefois, de graves insuffisances auxquelles il était devenu necessaire de porter remède.

Les conditions particulières de validité theorique des representations expérimentales proposées dans cette première etude font l'objet d'une analyse détaillée dont les résultats seront exposés ultérieurement.

REMERCIEMENTS.- Les auteurs tiennent à mentionner le soutien matériel apporté à leurs travaux par les organismes professionnels apicoles suivants : UNAF (Union Nationale de l'Apiculture Française), Syndicat des Apiculteurs du Vaucluse, Syndicat "l'Abeille Heraultaise", Etablissements ICKOWICZ (Bollène, Vaucluse), ainsi que l'organisation interprofessionnelle "Intermiel".

indiqué dans le cas de sujets dont la durée de vie totale est relativement courte, mais ne doit pas être exclu du cas général auquel il peut être adapté, par exemple, en retenant un TL_x dans lequel $x < 50\%$, ou l'intersection de la tangente au point d'inflexion avec l'axe des abcisses, qui donne une estimation du délai marquant le début d'accélération de la mortalité [6], et dont l'expression s'écrit [6] :

$$t_\Delta = TL_{50} . [(n_t - 1)/(n_t + 1)]^{(n_t+1)/n_t} \qquad (12)$$

Le paramètre n_t constitue un indice morphologique de l'allure des courbes de variations : il est d'autant plus élevé que le toxique accélère plus soudainement le taux de mortalité.

La valeur de Δ est, comme n_t, une fonction croissante des doses, dont la signification porte sur la durée de vie totale de l'abeille.

Les indices dn_{50} et $d\Delta_{50}$ sont totalement autonomes et n'impliquent aucun choix puisqu'ils sont spécifiquement ajustés à leur temps propre, qui est celui où l'accélération de la mortalité s'annule pour changer de signe, au cours de la vie de l'animal.

L'ensemble des données peut donc être caractérisé par ces trois paramètres, dont les valeurs numériques s'échelonnent dans l'exemple proposé, selon l'ordre suivant :

$$d\Delta_{50} > dn_{50} > dT_{50}$$

Le paramètre dT_{50} est donc, ici, le plus sensible. Il est intéressant de constater que les valeurs numériques obtenues s'étendent de 0,27 $g.l^{-1}$ à 0,93 $g.l^{-1}$, ce qui correspondrait respectivement aux DL_{50} mesurées à 16 jours et à 7 jours après le début du traitement.

Les méthodes actuellement préconisées pour la mesure d'une DL_{50} dans des conditions étroitement fixées [15] exigent un grand nombre d'abeilles pour un résultat nécessairement restreint aux seules conditions observées. Il en est de même des méthodes applicables sur le terrain [16], d'où l'on déduit des "taux de risques" [17] dont dépendra le classement des pesticides quant à leur action sur l'abeille.

BIBLIOGRAPHIE

1.NECTOUX, M., ANDRE, J.F., GUIRAUD, G., BOUNIAS, M. & POPESKOVIC, D., C. R. Soc. Biol., 1989, sous presse.

2.POPESKOVIC, D. & BOUNIAS, M., C. R. Soc. Biol., 1986, 180, 663-668.

3.NECTOUX, M., BOUNIAS, M. & POPESKOVIC. D., Revue Française d'Apiculture, 1987, 466, 399-400.

4.ZBINDEN, G. & FLURY-ROVERSI, M., Arch. Toxicol., 1981, 47, 77-99.

5.CHANTER, D.O. & HEYWOOD, R., Toxicology Letters. 1982, 10, 303-307.

6.BOUNIAS, M., Fundam. Clin. Pharmacol., 1989, 3, 1-9.

7.MILLER, C.L. & TAINTER, M.L., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1944, 57, 261-264.

8.FINNEY, D.J., Sanhkya, 1953, 12, 121-136.

9.BOUNIAS, M., Comp. Biochem. Physiol., 1979, 63B, 407-417.

10.ASSOCIATE COMMITTEE ON SCIENTIFIC CRITERIA FOR ENVIRONMENTAL QUALITY, Pesticide-Pollinator Interaction, 1981, 194pp.

11.BOUNIAS, M., Comp. Biochem. Physiol., 1978, 61A, 13-18.

12.BOUNIAS, M., DEBEVEC, M. & POPESKOVIC, D., Acta Veterinaria (Beograd), 1985, 35, 273-282.

13.HAVERTY, M.I. & DELL, T.R., Pestic. Sci., 1984, 15, 369-374.

14.MOLINENGO, L., J. Pharm. Pharmacol., 1979, 31, 343-344.

15.Commission des Essais Biologiques, Soc. Fr. Phytiatrie Phytoph., 1982, 95, 1-19.

16.FELTON, J.C., OOMEN, P.A. & STEVENSON, J.H., Bee World, 1986, 67, 114-124.

17.OOMEN, P.A., Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 1986, 51, 1205-1213.

18.EL-SHAKAA, S.M.A. & SHAHEIN, A., Z. Angew. Zool., 1987, 74, 321-327.

19.SCHULZ, A.L., Apidologie, 1984, 15, 401-420.

Tableau 1 - Paramètres décrivant les propriétés algébriques des cinétiques de mortalité de l'abeille à diverses doses de sulfate de cuivre.

$CuSO_4$ g/l	N*	nt	TL_{50}	Δ**
0	17	2,96±0,24	27,0±1,0	3,08
0,25	13	2,92±0,22	14,2±1,0	5,78
0,5	10	4,32±0,18	9,8±1,0	11,59
1	6	5,95±0,31	7,5±1,0	20,51
2	6	5,97±0,65	5,1±1,0	30,22

*N = nombre de points pris en compte pour le calcul.

**exprimée en % mortalité par jour.

Tableau 2 - Variations de la DL_{50} mesurée en fonction du temps choisi pour établir la relation entre mortalité et doses. Le calcul de régression des probits sur le Logn des doses a été effectué à partir de N couples de points. Les coefficients de corrélation des droites correspondantes sont désignés par (ρ).

Temps (jours)	6	7	10	13	17
DL_{50} ($g.l^{-1}$)	2,62	0,96	0,49	0,35	0,23
N	3	4	4	3	2
ρ	0,922	0,984	0,991	0,999	1,00

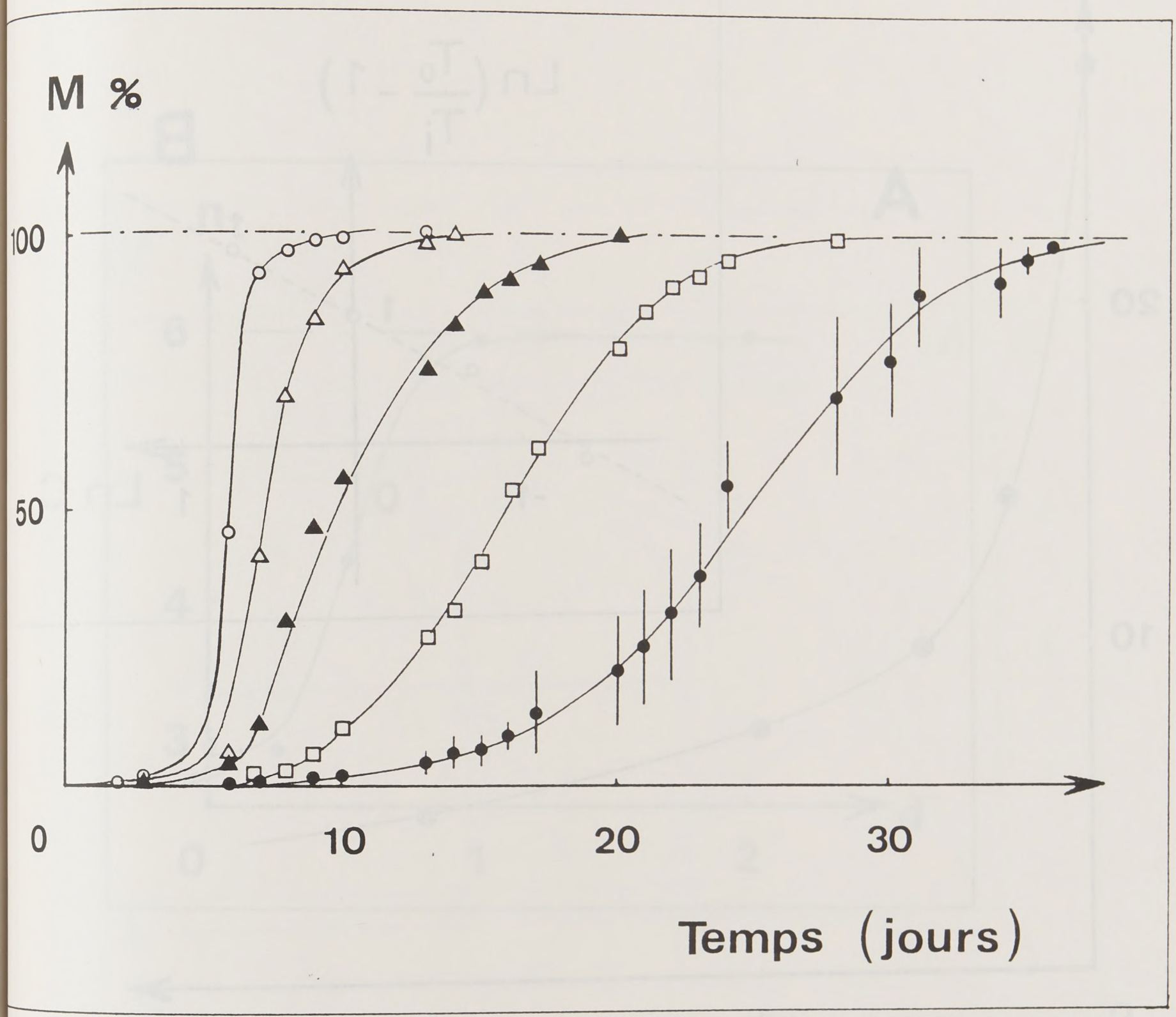


Fig. 1 - Variations de la mortalité (M%) des abeilles en fonction du temps pour diverses concentrations en sulfate cuivrique, administré en continu dans du sirop de saccharose. (♦) = témoins ; (□) = 0,25 g/l ; (▲) = 0,5 g/l ; (Δ) = 1 g/l ; (o) = 2 g/l. Les écarts types sont figurés, chez les témoins, pour N=3 répétitions.

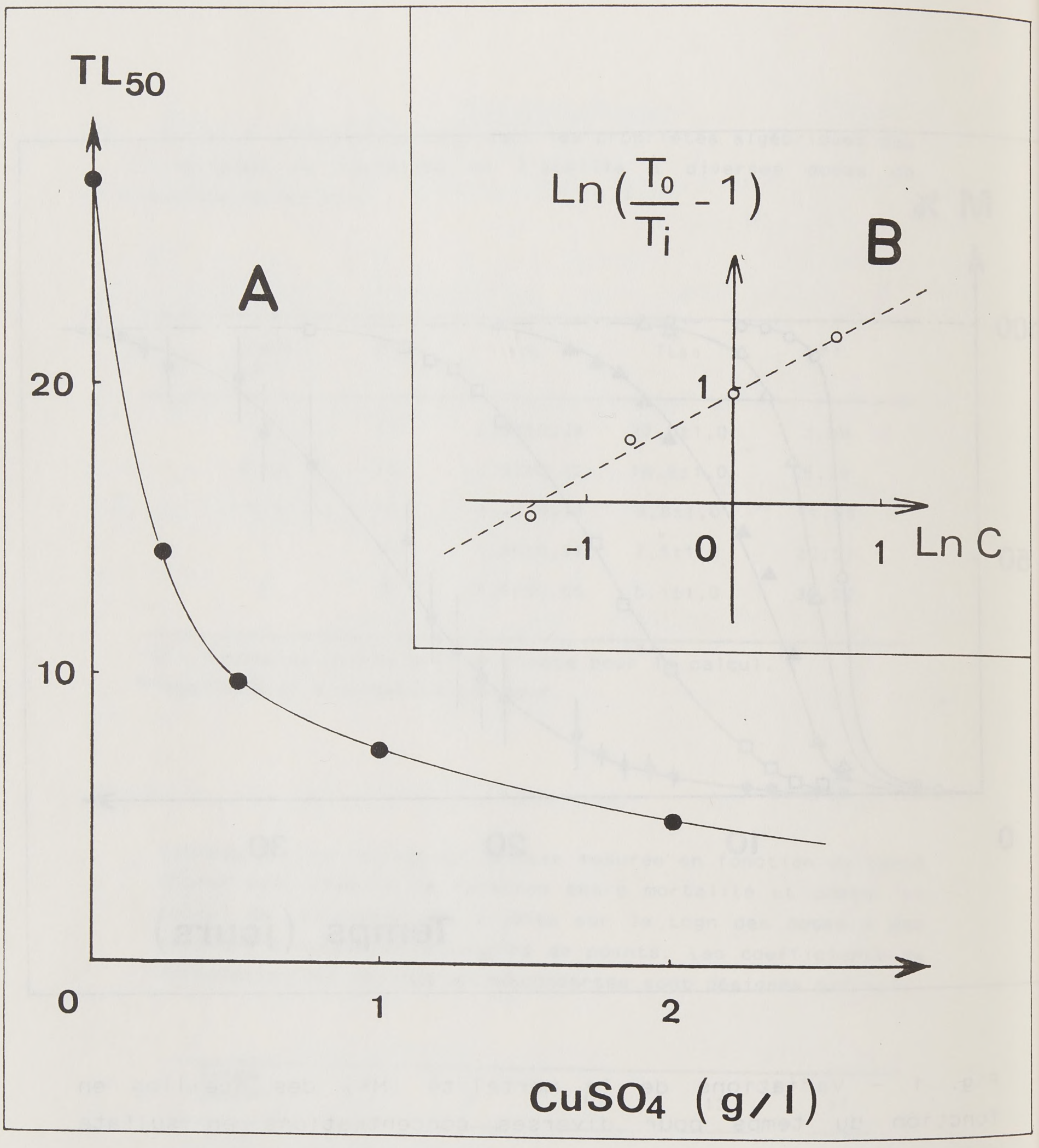


Fig. 2 - Variations du temps correspondant à 50% de mortalité (TL_{50}) en fonction des concentrations de sulfate cuivrique administré en continu. A = relation directe. B = forme logarithmique linéaire.

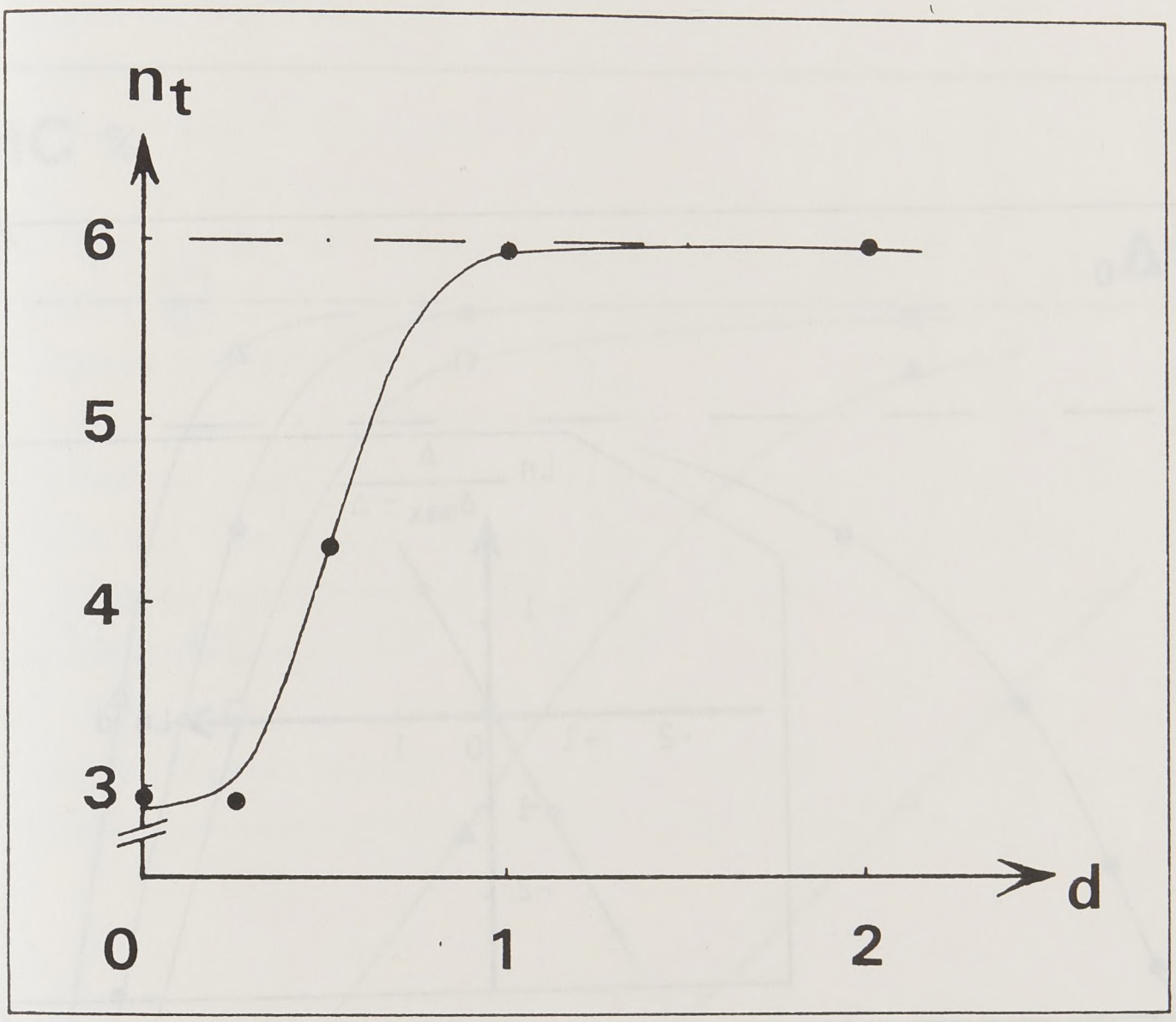


Fig. 3 - Variations du coefficient de Hill du facteur temps (n_t) en fonction des doses de sulfate cuivrique (d : g/l).

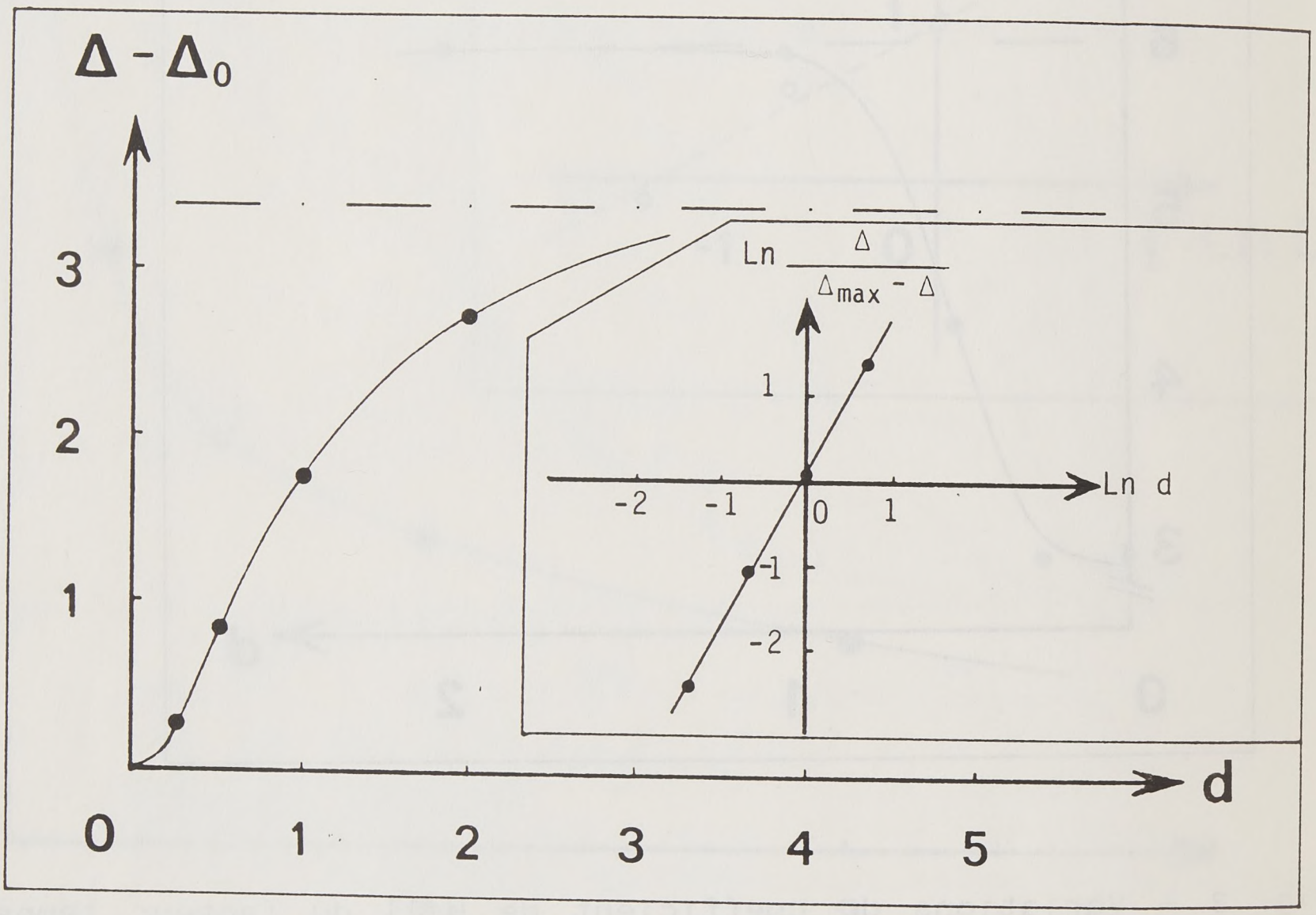


Fig. 4 - Variations de la vitesse maximale de mortalité (Δ) des abeilles recevant du sulfate cuivrique, diminuée de la valeur observée chez les témoins (Δ_0) en fonction des doses d (g/l). A : relation directe. B : forme logarithmique linéaire.

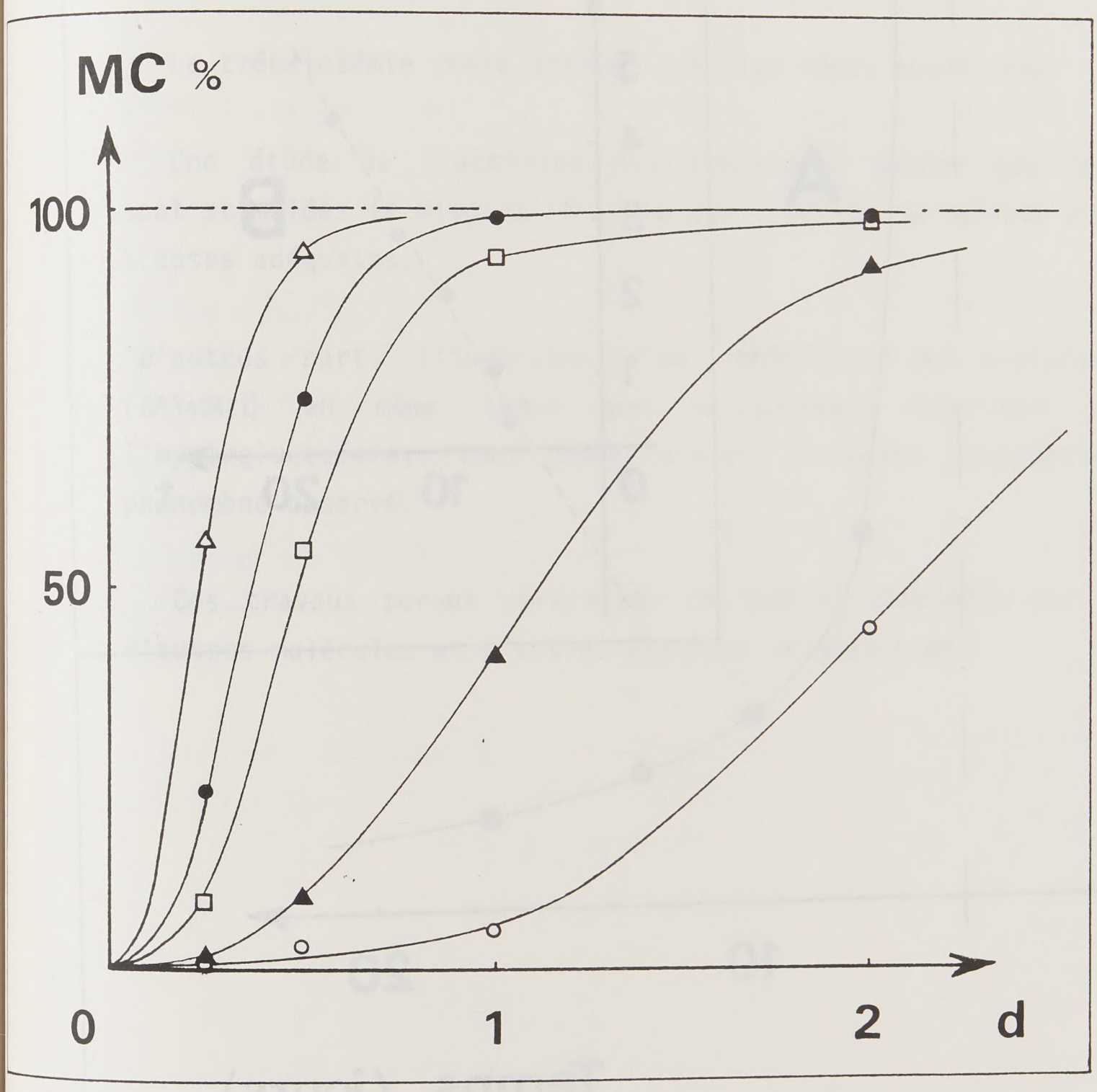


Fig. 5 - Taux de mortalité corrigée des abeilles (MC% selon Abbott) en fonction des doses de sulfate cuivrique (d : g/l) administré en continu : mesures effectuées au bout de 6 jours (o), 7 jours (▲), 10 jours (□), 13 jours (●) et 17 jours (△).

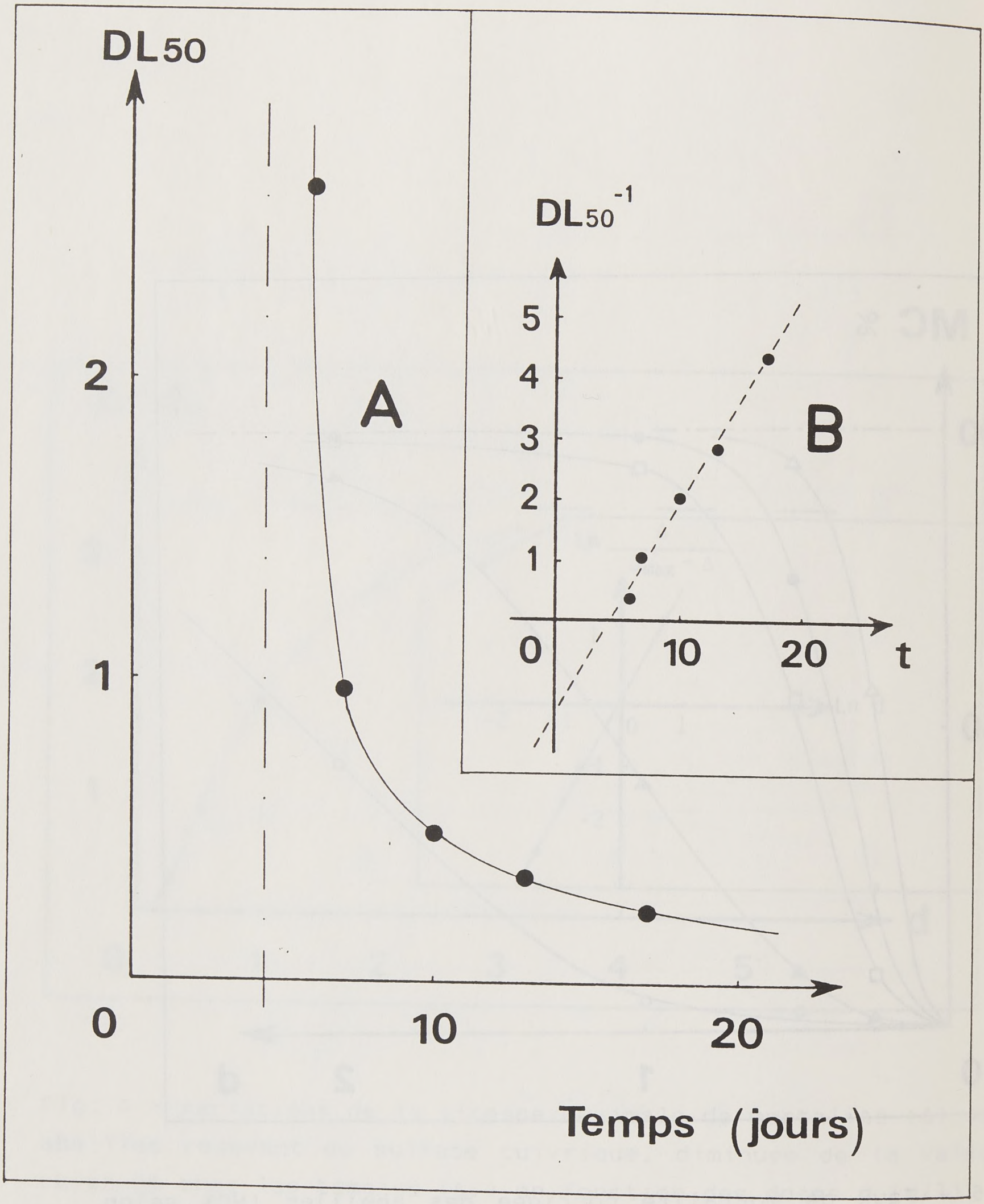


Fig. 6 - Variations des valeurs de la DL_{50} en fonction du temps au bout duquel elle a été mesurée. A = relation directe. B = transformation en coordonnées semi-inversées.

Effets biochimiques liés à l'injection de diverses doses de sulfate cuivrique in vivo.

L'injection de sulfate cuivrique à doses comprises entre 0,5 et 16 mM provoque une stimulation de la glucosémie à faibles doses seulement (0,5 à 4 mM), et n'entraîne pas de variations significatives aux doses plus élevées.

La tréhalosémie reste stable, dans les mêmes conditions.

Une étude de l'activité des tréhalases montre que celles-ci sont stimulées in vivo et in vitro par l'action du sulfate cuivrique à doses adéquates.

D'autres part, l'injection d'un inhibiteur des α-glucosidases (BAYg5421) en même temps que le gluconate cuivrique supprime l'hyperglucosémie, confirmant ainsi l'origine enzymatique du phénomène observé.

Ces travaux seront parachevés en 1989 et complétés par l'étude d'autres molécules et d'autres systèmes enzymatiques.

E - Biochimie des relations Hôtes/Parasites.

(Modèle : Pins sylvestres/Ips sexdentatus-Ceratocystis bruneociliata).

Ce travail constitue le sujet de thèse E.P.H.E. de Mme Daurade.

Des échantillons de liber de Pins sylvestre ont été prélevés sur des arbres ayant subi :

a) une perforation mécanique
b) une perforation par des scolytes
c) une perforation avec inoculation de champignon pathogène.

Les prélèvements ont été effectués 1-2 et 3 semaines après traitements, autour de la zone traitée ainsi qu'au point diamétralement opposé, sur le même arbre, à titre de comparaison. Une étude de base des arbres non traités avait été effectuée lors des années précédentes.

Les glucides libres, les phénols libres, et leurs conjugués, sous forme d'hétérosides phénoliques sont analysés par chromatographie avant et après hydrolyse des extraits.

L'analyse de structure du principal hétéroside se poursuit avec l'analyse des spectres des phénols libres après acidification, de manière à reproduire les conditions post-hydrolyse.

Des échantillons de liber de Pins sylvestre ont été prélevés sur des arbres ayant subi :

a) une perforation mécanique
b) une perforation par des scolytes
c) une perforation avec inoculation de champignon pathogène.

Les prélèvements ont été effectués 1-2 et 3 semaines après traitements, autour de la zone traitée ainsi qu'au point diamétralement opposé, sur le même arbre, à titre de comparaison. Une étude de base des arbres non traités avait été effectuée lors des années précédentes.

Les glucides libres, les phénols libres, et leurs conjugués, sous forme d'hétérosides phénoliques sont analysés par chromatographie avant et après hydrolyse des extraits.

L'analyse de structure du principal hétéroside se poursuit avec l'analyse des spectres des phénols libres après acidification, de manière à reproduire les conditions post-hydrolyse.

E - 1 - Analyse des réactions aux traitements.

◇ Rappel des échantillons déjà analysé.

- Prélèvements après 7 jours

. Perforation artificielle : 7 échantillons
Prélèvements 101-110-119

. Ceratocystis bruneo : 7 échantillons
Prélèvements 102-111-120

. Ips sexdentatus : 6 échantillons
Prélèvements 103-112-121

- Prélèvements après 14 jours

. Ceratocystis bruneo : 9 échantillons
Prélèvements 105-114-123

◇ Echantillons analysés en 1988

- Prélèvement 21 jours après inoculation par Ceratocystis bruneo.

La manip n°5 comprend 10 échantillons différenciés comme suit:

- 108	TLi	nu/Li	ext/Li 1	Ext Li 2
- 117	-	-	-	
- 126	-	-	-	

Nombre de plaques 12

Nombre d'enregistrements effectués 162

- Prélèvement 14 jours après infestation par Ips sexdentatus

La manip n°6 comprend 6 échantillons

106	TLi	un Li
115	-	-
124	-	-

ce qui a représenté 6 plaques et 81 enregistrements

- Prélèvement 21 jours après infestation par Ips sexdentatus

La manip n°7 comprend 7 échantillons :

127	TLi	un Li	ext Li
109	-	-	-
118	-	-	-

soit 12 plaques qui ont fait l'objet de 180 enregistrements.

- Perforation artificielle après 21 jours

6 échantillons : 107 TLi un Li
116 - -
125 - -
qui ont représenté 6 plaques et 81 enregistrements.

- Perforation artificielle après 14 jours

1 T Li un Li ext Li
1 - - -
1 - - - soit 7 échantillons
soit 6 plaques et 90 échantillons

En résumé, les 36 échantillons analysés cette année représentent 42 plaques déposées ce qui correspond à 594 chromatogrammes et environ 5300 dosages actuellement en cours de traitement (identification et quantification des pics).

Le mémoire de thèse est actuellement en cours de rédaction. L'analyse d'une centaine d'articles bibliographiques a permis l'ébauche de l'introduction et du premier chapitre sur les généralités.

E - 2 - Etude des phénols végétaux en milieu acide.

L'analyse des glucides des échantillons de liber de pin sylvestre avait donné lieu à l'isolement d'une fraction baptisée "fraction 10+15" dans laquelle la nature hétérosidique de certains constituants avait été mise en évidence par différentes méthodes chimiques (hydrolyse acide - hydrolyse enzymatique) grâce auxquelles la nature glucosique de l'hétéroside avait été mise en évidence. L'identification de l'aglycone restait à faire.

Lors du dosage des échantillons, les phénols conjugués se trouvent libérés par hydrolyse acide. Nous avons donc étudié le comportement en milieu acide des phénols végétaux étalons. Ce travail s'est porté sur 3 centres d'intérêts principaux : les spectres, la mobilité relative et l'influence des concentrations en HCl du milieu sur les mobilités relatives et les spectres.

Liste des substances phénoliques étudiées :

	PM
Acide cinnamique	148,2
Acide férulique	194,2
Acide caféique	180,2
Acide p. coumarique (ac. 4.hydroxycinn.)	164,2
Acide 2-hydroxy-cinn (ac.o.coumarique)	164,16
Acide 3-hydroxy-cinn (ac.m.coumarique)	164,16
Acide 2 Methoxy cinn.	178,19
Acide 3 Methoxy cinn.	178,19
Acide 4 Methoxy cinn.	178,19
Acide Protocatechique	154,12
Acide 2,3 di-hydroxy-benzoïque	154,12
Acide Gentisique (2-5 hydroxy benzoïque)	154,12
Acide 3,5 di Methoxy cinn.	208,21
Acide Isoferulique (3 Hydroxy-4 Methoxycin)	194,19
Acide 2,3 di methoxy cinn.	208,21

Acide 2,5 di methoxy cinn.	208,21
Acide 3,4 di methoxy cinn	208,21
Acide Sinapique	224,22
Acide Syringique	198,17
Acide chlorogenique	354,30
Acide o OH Benzoïque	138,13
Acide Vanillique	168,14
Ac. 3,5 dimethoxycinnamique	208,21

Les phénols étalons sont en solution dans l'acide chlorhydrique 2N final.

Les quantités déposées sont de 5 nanomoles pour les phénols testés, excepté l'acide cinnamique (10 nmoles).

Les variations de H_R ainsi que la comparaison des spectres ont été étudiés au cours du temps (de 0 à 6 heures).

1°) Les Spectres

Les spectres de 3 phénols : acide trans 3 méthoxy-cinnamique, l'acide caféique et l'acide p coumarique montrent une évolution dans le milieu acide qui se caractérise par la disparition du maximum secondaire situé aux environs de 240 nm (voir spectres).

2°) Mobilités relatives après un laps de temps de 0 à 6 heures dans HCl |2N|.

	To	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	T_6	H_2O
Ac. caféique	0,814	0,764	0,936	0,678	0,751	0,764	0,753	0,761
Ac. Ferulique	0,944	0,948	0,912	0,822	0,921	0,914	0,932	0,926
Ac. p coumarique	0,930	0,918	0,949	0,856	0,983	0,959	0,989	0,968
(4 OH cinn)	-0,904	0,882	0,947	0,869	0,946	0,944	0,940	(0,969)
Ac. 2 OH cinn.	0,872	0,870	0,894	0,841	0,880	0,926	0,875	(0,963)
Ac. 3 OH cinn.	0,867	0,899	0,861	0,841	0,792	0,918	0,828	(0,943)
Ac. 2 Me OH cinn.	1,083	1,036	1,051	0,943	1,014	1,023	C.A	(1,017)
Ac. 3 Me OH cinn	0,997	1,009	1,001	0,925	0,972	0,989	C.A	(0,999)
Ac. 4 Me OH cinn	1,034	1,017	1,029	0,926	1,019	1,057	C.A	(1,006)
Ac. 2.3								
Ac. cinnamique	1	1	1	1	1	1	1	1
Rf	0,89	0,93	0,75	0,87	0,80	0,83	0,83	0,81

x M_R par rapport à l'acide cinnamique
* CA en cours d'analyse

Mobilités relatives comparées

	solution acide (N=7)		eau
Acide caféique	0,78	0,07	0,761
Acide férulique	0,91	0,04	0,926 (0,925)
Acide o coumarique	0,88	0,03	(0,963)
(2 OH cinn)	0,86	0,04	(0,943)
Acide m coumarique	0,94	0,05	0,968
(3 OH cinn)	0,92	0,03	(0,969)
Acide p.coumarique	0,92	0,03	(0,969)
Acide 2 Me OH cinn	1,03	0,05	(1,017)
Acide 3 Me OH cinn	0,98	0,03	0,999
Acide 4 Me OH cinn	1,01	0,05	(1,006)
Acide cinnamique Rf	0,84	0,06	0,81

Les valeurs portées entre parenthèses et concernant le milieu aqueux correspondent à des mesures effectuées précédemment. Pour les étalons où les mobilités relatives ont été effectuées dans les deux cas nous constatons l'homogénéité de ces valeurs

Acide férulique	mesure 1987	0,925
	mesure 1988	0,926
Acide p coumarique	mesure 1987	0,969
	mesure 1988	0,968

on constate une mobilité statistiquement inférieur pour 3 étalons: les acides (O-m-p) coumariques, c'est-à-dire : hydroxy 2,3 et 4 cinnamique.

Nous avions déjà constaté certaines propriétés en milieu aqueux non acidifié. Les molécules ayant un radical hydroxy possèdent plus d'affinité pour la silice que pour l'éluant utilisé (M_R plus faible). Ce phénomène est accentué lorsque ce radical est situé en méta (3 OH).

Dans le milieu acide l'évolution de la mobilité relative qui se traduit dans les 3 cas par une baisse de la valeur du M_R semble donc augmenter l'affinité pour la silice des composés cinnamiques hydroxylés.

Corrélations entre la M.R. et la durée d'incubation en milieu acide.

	ρ	b	a	N
Acide caféique	-0,36	-0,013	0,82	7
Acide férulique	-0,17	-0,003	0,92	7
Acide p.coumarique	* 0,5	0,01	0,91	7
	* 0,53	0,01	0,89	7
Acide 2 OH cinn	-0,37	-0,005	0,87	7
Acide 3 OH cinn	-0,26	-0,005	0,87	7
Acide 2 Me OH cinn	-0,54	-0,01	1,06	6
Acide 3 Me OH cinn	-0,40	-0,01	1,00	6
Acide 4 Me OH cinn	0,02	0,005	1,01	6

3°) Influence des concentrations en HCl du milieu dans lequel l'étalon est en solution sur les chromatogrammes et sur les spectres.

Nous avons étudié 2 des phénols ayant montré une évolution de leur spectre en milieu acide.

1) cas de l'acide 3 méthoxy cinnamique

Le tableau indique les surfaces des pics mesurées aux différentes concentrations en HCl étudiées, soit de 0,001 N à 10 N pour des temps de 0 à 6 heures.

La moyenne totale (N=36) nous montre peu de variations dans les surfaces des pics selon les concentrations et au cours du temps. On pourrait imputer les différences à des difficultés de cadrage des taches lors de l'enregistrement en U.V.

Les graphes représentatifs des surfaces en fonction du Ln des concentrations pour chaque temps sont indiqués sur la figure jointe.

Variations de la surface du pic de l'acide hydroxy-3 cinnamique en fonction de la concentration en HCl lors de l'incubation préalable aux dépôts (3 mesures).

concentrations HCl(N)	surfaces mm^2		concentrations HCl(N)	surfaces mm^2	
0	228	28	0,10	191	15
0,001	158	27	0,50	196	42
0,005	223	25	1,00	205	
0,01	195	19	5,00	160	
0,05	197	40	10,00	161	

Phénomènes d'oscillations observés en fonction des concentrations en HCl pour une durée d'incubation déterminée.

Les modifications de la conformation des spectres se traduisent, lors de l'enregistrement d'un même pic à une longueur d'onde définie, par des variations de la surface du pic, liées aux variations de l'absorbance du produit à cette longueur d'onde.

2) Cas de l'acide caféique (3,4 Hydroxy cinnamique)

Mobilités relatives en fonction du temps et de la concentration en HCl.

	T_o	3 H	6 H
0,01 N	0,700	0,737	0,828
0,1 N	0,700	0,741	0,803
1 N	0,709	0,745	0,824

La concentration ne semble pas avoir d'effet sur le M_R tandis que le temps pendant lequel l'acide caféique a été dilué dans l'HCl provoque une augmentation du M_R.

Pour chaque concentration la progression du M_R en fonction du temps nous donne un bon coefficient de corrélation (ρ =0,972 pour 0,01N, ρ =0,993 pour 0,1N et 0,977 pour 1N).

Evolution des surfaces des pics dans les mêmes conditions

	T_o	3 H	6 H
0,01 N	56	72,25	80
0,1 N	69	76	112
1 N	52	68	88,375

L'analyse des surfaces de pics aboutit aux mêmes conclusions que pour les M_R :

- la concentration en HCl n'a pas d'effet sur la surface des pics.
- la durée pendant laquelle l'acide caféique a été dilué dans l'HCl.

L'augmentation des surfaces est directement proportionnelle au temps avec des coefficients de corrélation élevés (0,98 pour 0,01N ; 0,932 pour 0,1N ; 0,998 pour 1N).

On peut rapporter cet effet à la sutructure particulière de l'acide caféique qui est un di hydroxy de l'acide cinnamique. L'augmentation du Mr traduirait une lente transformation de l'acide caféique en un dérivé de polarité plus proche de celle de l'acide cinnamique (l'acide cinnamique a été notre substance de référence pour toute cette étude en ce qui concerne la mobilité relative : M_R ac. cinn=1).

3) Acide p.coumarique (3 OH acide cinnamique)

- Mobilité relative en fonction du temps et de la concentration en HCl.

	T_o	3 H	6 H
0,01 N	87	92	99,25
0,1 N	103,5	94	101,5
1 N	103,5	94,25	99

Pour l'acide p.coumarique le temps de contact avec l'HCl comme la concentration de ce dernier n'ont pas de conséquence sur le M_R.

Surface des pics

	T_o	3 H	6 H
0,01 N	525,5	602,875	658
0,1 N	610	696,5	717,5
1 N	640	604,625	686

La concentration en HCl n'a pas d'effet sur la surface des pics. Par contre le temps de contact de l'acide phénolique et du milieu acide provoque encore une fois une augmentation de la surface des pics proportionnelle à cette durée. Les corrélations pour 0,01N, 0,1N et 1N sont respectivement de 0,995, 0,943 et 0,564. Le coefficient de corrélation global sur les moyennes est de 0,998.

Du point de vue de la structure l'acide p.coumarique est un acide 3 Hydroxy cinnamique. On pourrait penser que la fonction OH interagit avec l'HCl du milieu de solution et que cette interaction ait une conséquence sur la surface des pics qui pourrait s'expliquer par une meilleure réponse du produit formé à la longueur d'onde d'enregistrement (310 nm).

BILAN DES COLLABORATIONS

EXTERIEURES

En France :

Université de Bordeaux : Tréhalases d'insectes (Dr. Moreau et Prof.Dutrieu)

Profession Apicole : lutte contre la varroose (M. André)

Université de Dijon : Acétylcholinestérases (Prof. Lenoir Rousseaux)

Université de Grenoble : Institut Max-Planck (Dr. John Kefuss)

A l'Etranger :

Allemagne : Université d'ULM (Prof. Dr. Maier)
Neuropeptides d'Abeilles
Publication en préparation

Angleterre : Université de Lancaster (Prof. Dr. Morgan)
α glucosidases d'Abeilles
Phosphatases végétales
13 publications parues

Autriche : Université de Graz (Prof. K. Crailsheim)
Cinétiques comparées de transport de la leucine (Plante/Insecte).
1 publication en préparation

Belgique : Université de Mons (Prof. J. Dierkens)/CEE
Projet : aspects exploratoires de toxicologie végétale

Etats-Unis : Université de Birmingham, Michigan (Dr. E. Sykes)
Mécanisme associatif des phosphatases alcalines
Recherches exploratoires sur la base des résultats découverts sur les α-glucosidases.

Inde : Université de Allahabad (Dr. J. Shanker)
Acad. Chimie de l'Agriculture (Pr. M. Bounias=membre)
Physiologie et Biochimie Végétale
Projet : toxicologie moléculaire végétale. Demande de 3 années de séjour sabbatique en France.

Pologne : Université de Szczecin (Prof. Dr. I. Kruk)
Institut de Physique
Physico-chimie de l'oxydation des amines biogéniques et de certains analogues pesticides.
4 publications parues

Yougoslavie : Université de Belgrade (Prof. Dr. D. Popeskovic)
Fac. Sc. Med. Vétér. (M. Bounias=Prof. associé)
Biochimie et toxicologie moléculaire chez l'Abeille
Lutte contre la varroatose
8 publications parues
1 thèse en préparation

IV - ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

L'année Universitaire étant à cheval sur l'année civile, c'est le cursus 1987-88 qui est pris en compte ici.

M. BOUNIAS a effectué 80 heures d'enseignement supérieur, réparties comme suit : (licence de Phytoprotection)

10 heures d'enzymologie (cinétique fondamentale)
10 heures de statistiques biologiques
60 heures de toxicologie (U.V. complète. Responsable de l'U.V.)

Les examens ont été assurés dans les 3 cas.

V - ETHIQUE DE LA RECHERCHE

Une longue suite d'échanges de réflexions avec le Dr. Jacques TESTART, de l'INSERM, ainsi qu'un groupe d'autres collègues de toutes les disciplines, a abouti à la rédaction d'un manifeste qui a été publié par la revue Nature, vol. 333, n°6172, p. 390 (1988).

Ce travail ne constitue qu'une introduction à une analyse plus approfondie du problème.

NATURE, 1988, 333(6172), 390.

Towards a better control over science

SIR—The desire to understand the world has today been overtaken by the necessity of exploiting it. Scientific results and advances are for the most part produced within institutions whose ultimate aims are technological. The direction in which research, whether 'fundamental' or 'applied', proceeds is governed by economic, social, health-related or military considerations.

This orientation cannot be ignored by research workers and society has the right to pass judgement on it. With its reductionist viewpoint and disregard for all other forms of truth and knowledge, science puts itself in conflict with nature, culture and individuals.

Thus, unless science can be brought under control, it represents a serious risk to the environment, to mankind and to individuals. Scientific development continues, however, and promotes its own acceleration, with the naive assent of a society whose only vision of the future is expressed in terms of technological artefacts, although the identification of scientific achievement with progress, or even happiness, is largely imaginary. The increasing rate of scientific output is causing a qualitative change in the dependence of the individual on science. This is obvious for the practical aspects of life, which are constantly being altered by technology, but also holds for its more private aspects. The concepts of subjectivity, privacy and secrecy are being vigorously attacked by scientific disciplines which probe deeper and deeper and, while they are unable to understand everything, claim to explain everything. In the name of scientific truth, life is reduced to its measurable aspects. The increasingly narrow specialization of scientists encourages their shortsightedness as to their role in society and creates insurmountable barriers between the different scientific disciplines.

It is certainly difficult to turn back from technological advances resulting from scientific endeavour, which themselves create new demands in an industrial spiral which neither scientists nor consumers can control. We believe that clear thinking is more important than efficiency and the direction of research more important than the speed at which it is accomplished. We believe that reflection should precede any scientific project rather than following any innovation made. We believe this reflection has to be philosophical rather than technical in nature, and that it should take place across interdisciplinary barriers and include the whole of society.

J. Arsac (Informatique, Univ. Paris VI), M. Bouteiss (Biochimie, Univ. Avignon), M. Cosse (Astrophysique, C.E.N. Saclay), J.P. Delhaye (Physique, Univ. Paris VII), A. Gsponer (Physique des hautes energies, ISRI, Geneve), A. Jacquard (Genetique, INED, Paris), J.M. Levy-Leblond (Physique Theorique, Univ. Nice), J.M. Meyer (Embryologie, Univ. Strasbourg), F.B. Michel (Pneumologie, Univ. Montpellier), J. Passeri (Immunologie, CNRS-Pasteur), B. Prum (Statistique medicale, Univ. Paris V), J-P. Renard (Embryologie, INRA-Pasteur), J-C. Salomon (Cancerologie, CNRS, Villejuif), J-P. Schneider (Astronomie, CNRS, Nice), J-P. Shapira (Physique nucleaire, Orsay), M. Sintzoff (Informatique, Univ. Louvain), J. Testart* (Biologie, INSERM, Clamart)

*Corresponding author: J. Testart, INSERM U. 187, Hopital Antoine Beclere, 92141 CLAMART, France.

Ozone depletion

SIR—Some of the views in your recent leading article on ozone cannot be allowed to pass unchallenged. Those working in the field will smile wryly at the thought that financial support has been generous. Some satellite instruments were designed under cost constraints that precluded planning for extended operation. Long-term monitoring activities have been despised as 'routine', and support for them severely cut back. Problems vary from country to country. In the United States, it seems easier to get support for building instruments than for providing the resources to make prompt and good use of the data acquired. In Britain, lack of capital (and over-rigid accounting rules) has severely limited the capacity to build or deploy suitable instruments. World-wide, many major field and laboratory studies could not have been undertaken without substantial support from the Chemical Manufacturers' Association.

Insufficient funds also explain why the arguments used in discussing the environmental effects of ozone depletion are so often emotive. Recommendations have been made at intervals since 1974 for comprehensive long-term research into the effects on man, animals, plants and materials of increased fluxes of ultraviolet radiation. They have yet to be acted upon.

The most pressing question, however, is this — is current understanding of the processes that control the abundance of ozone sufficient to justify existing policies on halocarbon emissions? There is no longer any doubt that halocarbons are primarily responsible for the effects observed in Antarctica. The Ozone Trends Panel has found definite evidence outside Antarctica for ozone depletion over two decades, overlain by effects of the solar cycle. The observed cyclic change of ozone is simulated fairly well by models. However, when allowance is made for increase of tropospheric ozone, these models significantly underestimate the underlying trend in stratospheric ozone. There are no grounds for complacency — the assumption in the Montreal Protocol that the halogen content of the atmosphere can be allowed to increase is no longer tenable. The protocol must be swiftly ratified, and strengthened.

J.C. Farman

British Antarctic Survey,
High Cross,
Madingley Road,
Cambridge CB3 0ET, UK

1. Nature 332, 291 (1988).
2. Nature 332, 201 (1988).

Stations in space

SIR—The anonymous writer of your editorial 'Stations in space' (*Nature* 332, 292, 1988) seems not to have thought very deeply about the future of space exploration. The most important purpose of the space station is the experience that will be gained during its construction. All other suggested purposes are, to some extent, icing on the cake. The future of space exploration, including that of space science carried out from Earth orbit, will largely depend on the ability to manufacture large structures in space, and the building of the space station will pioneer the necessary technology.

It should be self-evident that the continued manned (or even large-scale unmanned) exploration of the Solar System will depend on the assembly of large spacecraft in Earth orbit. The experience to be gained by the construction of the space station will be an essential prerequisite to these ventures. Moreover, while your writer is quite right about the immense value to astronomy of the space telescope, this instrument should not be seen as the culmination of space astronomy. It is certainly possible, in principle, to build larger instruments, but, again, these will have to be assembled in space and the above argument is just as valid. Important though the space telescope is in the short term, history is likely to show that the ability to construct large space structures (telescopes, space ships and so on) will be of more lasting scientific value. Make no mistake, this technology, carried to its logical conclusion, will enable us to send instruments to the stars.

Finally, large-scale investment in space is important because it provides business for high-technology companies which would otherwise be producing weapons. This is important because only when such alternative business is found will disarmament become acceptable to the US military–industrial complex. In fact, given the magnitude of US military spending, the argument that the federal deficit makes the space station an irresponsible undertaking looks a little silly.

Eve Crawford

University of London Observatory,
Mill Hill Park,
London NW7 2QS, UK

COMPTE RENDU ADMINISTRATIF

I - BILAN BUDGETAIRE

1) Budget "Fonctionnement"

a) Ressources

Dotation initiale	112.849,20
Dotation supplémentaire du Dept.	45.895,00
AIP "AChe"	30.000,00
Crédit MOO	13.420,00
Crédit téléphone	3.512,00
Facturation SICA "cerises"	1.264,76

b) Dépenses

Fournit. Entr. Petit Mat. Equip.	32.745,82
Produits chimiques	15.965,60
Fournitures administratives	14.039,35
Entretien Réparations Mob. Mat.	5.861,85
Documentation technique	26.177,13
Déplacement en France	13.383,95
Affranchissements	8.243,89
Charges externes diverses	14.062,28
Xérox Services généraux	6.652,10
Téléphone	8.590,11
Mme QUIROS (Femme de ménage)	11.531,15
T.U.C. et stagiaires	10.830,00
Mobilier et Matériel de bureau	10.644,71
Matériel scientifique	46.778,10

Bilan : - 50.076,08 F.

---

2) Budget Equipement

Dotation	300.000,00
Achat d'une centrifugeuse	299.800,00

Bilan : + 200,00 F.

II - DEMANDES POUR 1989

1 - Fonctionnement

Les négociations concernant le budget général sont compliquées par le fait que l'autre service de la station (Pollution) est un laboratoire de prestation de service excluant du budget commun la dotation provenant des recettes. Les éléments pour 1989 sont consignés en annexe.

La demande globale pour l'ensemble du laboratoire (3 thèses en préparation) est la suivante, après répartition des frais généraux au prorata du taux d'occupation par chaque service :

150.800 F.

2 - Equipement

Trois postes sont maintenant demandés en première urgence, et couvriront les besoins pour plusieurs années :

a - Un spectrodensitomètre CCM destiné à doubler l'unique appareil actuel (pivot du labo) totalement saturé et à prévoir la relève en raison de signes de défaillance manifestés depuis un an. Coût : 220.000 F.

b - Un "scanner" de radioactivité β pour l'étude sur CCM des interactions ligands-récepteurs. Coût : 230.000 F.

c - Un appareil OPLC, permettant de développer la CCM sous pression et d'augmenter considérablement ses performances. Coût : 100.000 F.

ANNEXES

première proposition :

REPARTITION DU BUDGET 1989

BUDGET PRIMITIF dépenses autorisées	862 003,00 F
Moins Recettes à faire en 1989	450 000,00 F
TOTAL	412 003,00 F

Dotations prélevées à la source
Entretien du batiment - 60 000,00 F

BUDGET RESTANT

412 003,00 - 60 000,00 = 352 003,00 F

REPARTITION au prorata des parts chercheurs/ingénieurs

BIOCHIMIE = $\frac{2}{6}$ = 117 335,00 F

POLLUTION = $\frac{4}{6}$ = 234 668,00 F

Demande budgétaire pour 1989 : Argumentation opposée à la répartition unilatérale des crédits

La répartition du budget de la station, telle qu'elle m'a été adressée, relève plusieurs erreurs qu'il convient de rectifier.

1°) Les dotations sont réparties au prorata des parts chercheurs/ingénieurs: en l'état actuel, les deux services comptent respectivement, trois postes effectifs (Pollution), et deux postes effectifs (Biochimie) de sorte que la répartition doit se faire sur la base 3/5, 2/5 (et non 4/6, 2/6), seule représentative de la réalité.

2°) Les charges d'entretien, fluides, etc. doivent être réparties au prorata de l'occupation effective par chaque service (le nombre total de personnes et les surfaces occupées sont actuellement dans les proportions respectives : 2/3 pollution, 1/3 biochimie).

Je voudrais rappeler, à titre d'exemple, que la femme de ménage est même présente une matinée sur 4 au rez-de-chaussée (Biochimie et entrée commune) et 3 matinées en pollution, ce qui devrait être également revu. Les frais de marche et d'entretien des véhicules de service devraient, par ailleurs, être répartis en fonction de l'utilisation réelle de chacun, facilement calculable en Km parcourus.

Pour 1989, l'estimation suivante me paraîtrait moins déséquilibrée.

Frais généraux :

Pollution 60.000x2/3 = 40.000 soit 10.000 à déduire

Biochimie 60.000x1/3 = 20.000 soit 10.000 à ajouter

Répartition des parts chercheurs/ingénieurs :

Pollution 352.003x3/5 = 211.201

Biochimie 352.003x2/5 = 140.801

Bilan :

Pollution : 211.201 - 10.000 = 201.201

Biochimie : 140.801 + 10.000 = 150.802

(M. BOUNIAS)

UNIVERSITE D'AVIGNON
&
INRA

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE
Centre de Recherche d'Avignon
Domaine St-Paul - BP 91
84140 MONTFAVET

Le 27 février 1989

Objet :

Repartition du budget 1989 M. le Comité

La repartition du budget de la station, telle qu'elle m'a ete adressee, revele plusieurs erreurs qu'il convient de rectifier.

1°) Les dotations sont reparties au prorata des parts chercheurs/ingenieurs : en l'etat actuel, les deux services comptent respectivement, trois postes effectifs (Pollution), et deux postes effectifs (biochimie) de sorte que la repartition doit se faire sur la base 3/5, 2/5 (et non 4/6, 2/6), seule representative de la realite.

2°) Les charges d'entretien, fluides, etc. doivent etre reparties au prorata de l'occupation effective par chaque service (le nombre total de personnes et les surfaces occupees sont actuellement dans les proportions respectives : 2/3 pollution, 1/3 biochimie).

Je voudrais rappeler, a titre d'exemple, que la femme de menage est mise presente 1 matinee sur 4 au rez-de-chaussee (biochimie et entree commune) et 3 matinees en Pollution, ce qui devrait etre egalement revu. Les frais de marche et d'entretien des vehicules de service devraient, par ailleurs, etre repartis en fonction de l'utilisation reelle de chacun, facilement calculable en km parcourus.

Pour 1987, l'estimation suivante me paraîtrait moins desequilibrée.

Frais généraux :

Pollution 60.000 x 1/3 = 40.000 soit 10.000 à déduire.
Biochimie 60.000 x 1/3 = 20.000 soit 10.000 à ajouter.

Répartition des parts : chercheurs/ingénieurs :

Pollution 352.003 x 1/3 = 211.201
Biochimie 352.003 x 2/3 = 140.801.

Bilan :

Pollution : 211.201 - 10.000 = 201.201
Biochimie : 140.801 + 10.000 = 150.802.

c/c : M. Descoins
M. Latiere

INRA
Institut National de la Recherche Agronomique

STATION DE PHYTOPHARMACIE

le 1er mars 1989

Annule et remplace la précédente répartition

Répartition du Budget 1989

BUDGET PRIMITF 862 003,00 F

Moins Recettes à faire en 1989 - 450 000,00 F

TOTAL 412 003,00 F

A PRELEVER AVANT REPARTITION

- crédit dotation Etat : Téléphone (location ligne + entretien standard)+ M.O. femme de ménage = 69 780,00 F
- frais généraux de la Station : (EDF, fuel, eau, APAVE etc...) = 50 000,00 F

TOTAL 119 780,00 F

IL RESTE A REPARTIR

412 003,00 F - 119 780,00 F = 292 223,00 F

Personnel par service

BIOCHIMIE : MM. BOUNIAS BELZUNCES = 2 parts

POLLUTION : MM. de CORMIS - LUTTRINGER
Melles ROLLE - REYNAUD (Boursière INRA)
+ CR1 à pourvoir en juin = 4 parts

Part chercheur : $\frac{2992\ 223}{6}$ = 48 703,83 F arrondi à 50.000 F

DOTATION	BIOCHIMIE	2 x 50.000 F	=	100 000,00 F
	POLLUTION	4 x 50 000 F	=	192 223,00 F

N.B. Le service de Biochimie n'aura plus à supporter le salaire de la femme de service qui est couvert en totalité par la dotation Etat maintenant budgétisée.

Domaine Saint-Paul — B.P. 91 — 84140 MONTFAVET — Tél. 90.31.60.00 — Télex INRAAVI 432870 F

INRA

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE
Centre de Recherche d'Avignon
Domaine St-Paul - BP 91
84140 MONTFAVET

République Française
Ministère de l'Enseignement Supérieur et
de la Recherche
Ministère de l'Agriculture

Département de
Phytopharmacie et Ecotoxicologie
Station d'Avignon
[AVIGNON PHYTECO : 21-631]
Tél : 90.31.60.58
Télex : INRAAVI 432870 F

Le 2 Mars 1989

La nouvelle proposition de répartition ne répond à aucune des objections que j'ai formulées et aggrave considérablement le déséquilibre entre les deux services.

Il est significatif de constater que la répartition en amont, c'est-à-dire à parts égales entre les deux services, aboutit à ce que le quota des charges de la station représente effectivement :

- 60% du budget Biochimie
- 9,3% du budget Pollution

Les données se passent de commentaires et je ne peux, en l'occurence, que m'en tenir à mon estimation précédente.

Michel Bonnin

Montant retenu :
150 802 F

ECHANGES DE TIRES A PART SCIENTIFIQUES ET CLASSEMENT BIBLIOGRAPHIQUE

Au cours de l'année 1988, comme lors des années précédentes, des demandes de tirés à part de publications ont été d'une part adressées à leurs auteurs, et d'autres part reçues au laboratoire. En outre, les références anciennes ou non munies de l'adresse du premier auteur ont fait l'objet de demandes de tirages au service central de documentation.

Le bilan 1988 s'établit comme suit :

Nombre de documents échangés : 1135
Nombre de demandes reçues : 163
Nombre de demandes envoyées
aux auteurs : 432
au CNRA : 703

Ce travail, strictement inhérent à la recherche, et indispensable à la mise à jour permanente des connaissances, implique un lourd travail de secrétariat documentaliste puis de classement des documents et des fiches établies pour chacun d'eux.

Ceci constitue une grande part du travail confié à Madame N. BARESTE
à laquelle revient, en outre la charge de dactylographie des manuscrits et pour finir, celle de la réalisation matérielle du présent rapport.

LISTE DES PUBLICATIONS

PARUES EN 1988

- BOUNIAS, COULOMB C., LIZZI Y., COULOMB Ph. J. - 1988 - Comparative effects of a fungal and a viral infection with the action of an elicitor on the photosynthetic pigments of the leaves of susceptible and resistant varieties of Capsicum annuum. **Ind. J. Agric. Biochem., 1**(1), 1-10.

- BOUNIAS M. & JORAND J.P. - 1988 - Séparation et dosage densitométrique sur couches minces de gel de silice des acides azélaïque et pimélique révélés au vert de bromocrésol. **Analusis, 16**(2), 107-109.

- NIZEYIMANA B., BOUNIAS M. & VIVARES C.P. - 1987 -Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de Aedes aegypti (Insecte Diptère) par la δ-endotoxine de Bacillus thuringiensis israëlensis. II - Les lipides abdominaux. **C.R. Soc. Biol., 181,** 355-363.

- NECTOUX M., BOUNIAS M. & POPESKOVIC D. - 1987 - Varroase, lutte biochimique. I - Les cibles cuproprotéiques liées au métabolisme respiratoire. **Rev. Fr. Apic., 466,** 399-400.

- NECTOUX M., BOUNIAS M. & POPESKOVIC D. - 1987 - Varroase, lutte biochimique. II - Antagonistes des métaux intervenant dans le fonctionnement de cofacteurs enzymatiques. **Rev. Fr. Apic., 467,** 445-446.

VEVE J.C. & BOUNIAS M. - 1987 - Etude théorique de l'action des champs électromagnétiques sur les fonctions biochimiques. Premier Congrés International de Kinésithérapie Energétique, Tours, 17-18 Octobre 1987, (4 pp).

- VIVARES C.P. & BOUNIAS M. - 1988 - Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves d'Aedes aegypti (Insecte, Diptère), par la delta-endotoxine de Bacillus thuringiensis israelensis. III - Les amino-acides libres de l'hémolymphe impliqués dans l'osmorégulation. **C.R. Soc. Biol., 181,** 666-676.

- BOUNIAS M. - 1988 - Intéraction du propranolol et de la somatostatine avec la réponse octopaminergique de la lipémie de l'abeille in vivo. **C.R. Soc. Biol., 182,** 37-43.

- BOUNIAS M., NECTOUX M., GUIRAUD G., CASCINO P. & POPESKOVIC D.S. - 1988 - Les facteurs influençant les traitements par nourrissement (traitements "systémiques"). **Rev. Fr. Apic., 470,** 20-22.

- BOUNIAS M. - 1988 - Rigorous determination of the Hill coefficient of non michaelian substrate-inhibited enzymes. **Biochem. Internat., 17**(1), 147-154.

- BELZUNCES L., TOUTANT J.P. & BOUNIAS M. - 1988 - Acetylcholinesterase from Apis mellifera head. Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by Triton X-114 phase separation. **Biochem. J., 255**(2), 463-470

- BOUNIAS M., NECTOUX M., GUIRAUD G., CASCINO P., ANDRE J.F. & POPESKOVIC D. - 1988 - Les recherches contre la Varroatose de l'abeille au laboratoire de Biochimie de l'INRA d'Avignon : Un an après ... . **L'Abeille de France, n° 728,** 284-286.

- BELZUNCES L., LENOIR-ROUSSEAUX J.J. & BOUNIAS M. - 1988 - Properties of acetylcholinesterase from Apis mellifera heads. **Insects Biochem., 18**(8), 811-819.

- BOUNIAS M. - 1989 - Algebraic potential of the Hill equation as an alternative tool for plotting dose (or time) effects relationships in Toxicology : a theoretical study. **Fundam. Clin. Pharmacol., 3**(1), 1-9

- BOUNIAS M., DAURADE M.H. & LIZZI Y. - 1988 - Développements de la spectrophotométrie en phase solide sur chromatogrammes en couche mince. **Symp. CCM "Merck",** Maison de la Chimie, Paris, 13/10/88.

- ARSAC J., BOUNIAS M., CASSE M., DELEAGE J.P., GSPONER A., JACQUARD A., LEVY-LEBLOND J.M., MEYER J.M., MICHEL F.R., PANUEL J., PRUM B., RENARD J.P., SALOMON J.C., SCHEIDECKER J.P., SHAPIRA J.P., SINTZOFF M. & TESTART J. - 1988 - Towards a better control over science. **Nature, 333**(6172), p. 390.

- BOUNIAS M., DEBEVEC M. & POPESKOVIC D. - 1988 - Manifestations homéostasiques et thanatologiques de la lipémie des larves d'abeilles du 5e stade conservées hors de leurs alvéoles. **C.R. Soc. Biol.**

- BOUNIAS M., VIVARES C.P. & NIZEYIMANA B. - 1988 - Functional relationship between free amino-acids in the haemolymph of IVth instar larvae of the mosquito Aedes aegypti (Diptera, Culicidae) as a basis for toxicological studies. **J. Invert. Pathol.**

- KRUK I., LICHSZTELD K., MICHALSKA T. & BOUNIAS M. - 1988 - Evidence for the generation of singlet molecular oxygen during Dopa and Dopamine peroxidation. **Zeitschrift für Naturforschung, 44**(2), 52-57.

- NECTOUX M., GUIRAUD G., ANDRE J.F., BOUNIAS M. & POPESKOVIC D. - 1989 - Bilan expérimental des potentialités toxiques du sulfate de cuivre dans la lutte contre la varroatose de l'abeille. **C.R. Soc. Biol., 182,** 466-477.

- NECTOUX M. & BOUNIAS M. - 1989 - Toxicologie du sulfate cuivrique chez l'abeille. I - Nouveaux paramètres algébriques de létalité comme alternative à la DL50. **C.R. Soc. Biol.,**